

Aus dem Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Institut für Virologie

Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker

Funktionelle Charakterisierung der Glykoproteine eines neu entdeckten afrikanischen Henipavirus



Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Weis

aus Heidelberg

Marburg an der Lahn, 2014

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
15.04.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Frau Prof. Dr. A. Maisner

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. T. Worzfeld

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-------------|
| Zusammenfassung | VI |
| Summary..... | VIII |
| I. Einleitung | 1 |
| 1.1 Henipaviren | 1 |
| 1.2 Henipavirus-Reservoir | 1 |
| 1.3 Hendravirus-Infektionen in Pferden und Menschen..... | 2 |
| 1.3.1 Erster Ausbruch 1994 | 2 |
| 1.3.2 Neuere Hendravirus-Ausbrüche..... | 3 |
| 1.3.3 HeV-Impfstoff | 3 |
| 1.4 Nipavirus-Infektionen in Schweinen und Menschen..... | 4 |
| 1.4.1 Erster Ausbruch 1998/99 | 4 |
| 1.4.2 Jüngere Nipavirus-Ausbrüche in Bangladesch | 5 |
| 1.4.3 Verlauf einer NiV-Infektion im Menschen | 6 |
| 1.5 Henipavirus-Impfstoffe und Therapien für Menschen..... | 7 |
| 1.6 Das afrikanische Henipavirus GH-M74a | 8 |
| 1.6.1 Die Entdeckung neuer Paramyxoviren..... | 8 |
| 1.6.2 Genomanalyse von GH-M74a..... | 12 |
| 1.7 Henipavirus-Glykoproteine..... | 14 |
| 1.7.1 Virusaufbau..... | 14 |
| 1.7.2 Glykoprotein G | 14 |
| 1.7.3 Fusionsprotein F | 16 |
| 1.7.4 Rolle der henipaviralen Glykoproteine im Replikationszyklus | 18 |
| 1.8 Henipavirus-Rezeptoren: EphrinB2/B3..... | 20 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.9 | Henipavirus-Aktivierungsproteasen: Cathepsin B und L | 21 |
| 1.10 | Aufgabenstellung | 22 |
| II. | Ergebnisse | 24 |
| 2.1 | Herstellung der M74-Plasmide | 24 |
| 2.2 | Biologische Aktivität der M74-Glykoproteine in verschiedenen Zelllinien | 26 |
| 2.2.1 | Expressionsnachweis der M74-Glykoproteine | 26 |
| 2.2.2 | Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in HypNi/1.1- und Vero-Zellen | 28 |
| 2.2.3 | Untersuchungen zur Koexpression der M74-Glykoproteine..... | 29 |
| 2.2.4 | Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in weiteren/verschiedenen Henipavirus-permissiven Zelllinien..... | 31 |
| 2.2.5 | Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine bei heterotypischer Koexpression mit den NiV-Glykoproteinen | 33 |
| 2.3 | Charakterisierung der Fusionsaktivität in HypNi/1.1-Zellen | 34 |
| 2.3.1 | Vergleich der M74-Glykoproteinexpression in verschiedenen Zelllinien | 34 |
| 2.3.2 | Untersuchungen zur Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in einem Overlay-Fusionsassay | 36 |
| 2.4 | Charakterisierung des intrazellulären Transport und der Aktivierung des M74-F-Proteins | 37 |
| 2.4.1 | Vergleich der M74-F und NiV-F Oberflächenexpression..... | 37 |
| 2.4.2 | Untersuchung der Spaltkinetik und Stabilität des M74-F | 39 |
| 2.5 | Charakterisierung chimärer M74-F-Proteine | 41 |
| 2.5.1 | Klonierung der chimären F-Proteine | 41 |
| 2.5.2 | Expressionsnachweis der chimären F-Proteine | 41 |
| 2.5.3 | Oberflächenexpression der F-Chimären | 42 |
| 2.5.4 | Untersuchung der Spaltkinetik und Proteinstabilität der F ₂ /F ₁ -Chimären durch <i>Pulse Chase</i> Analysen..... | 43 |
| 2.5.5 | Fusionsaktivität der F-Chimären | 45 |
| 2.6 | Einfluss von Startcodon-Mutationen auf die M74-F Expression..... | 47 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.6.1 | Untersuchung verschiedener Startcodon-Mutanten..... | 47 |
| 2.6.2 | M74-F mit (<i>in silico</i>) „rectified“ Sequenz..... | 48 |
| 2.6.3 | GH-p28: Afrikanisches Henipavirus mit zusätzlichem Startcodon an Position 91 | 50 |
| 2.6.5 | Fusionsaktivität der I91M Mutanten | 52 |
| 2.7 | Charakterisierung der M74-F-aktivierenden Protease..... | 54 |
| 2.7.1 | Intrazelluläre Verteilung des M74-F-Proteins..... | 54 |
| 2.7.2 | Einfluss von Inhibitoren des sekretorischen <i>pathways</i> auf die F- Aktivierung | 55 |
| 2.7.3 | pH-Abhängigkeit der M74-F-Spaltung..... | 58 |
| 2.7.4 | Einfluss von Cathepsin-Inhibitoren auf die proteolytische Prozessierung des M74-F-Proteins | 59 |
| III. | Diskussion..... | 61 |
| 3.1 | Fusionsaktivität in verschiedenen Zelllinien | 61 |
| 3.2 | Heterotypische Fusionsaktivität | 62 |
| 3.3 | Ineffektiver F-Oberflächentransport und Spaltung..... | 63 |
| 3.4 | M74-F-Spaltung durch Cathepsine | 64 |
| 3.5 | Veränderung im Startcodon des M74-F..... | 65 |
| 3.6 | Identifikation neuer Henipaviren | 68 |
| IV. | Material | 71 |
| 4.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 71 |
| 4.2 | Enzyme..... | 73 |
| 4.3 | Inhibitoren | 73 |
| 4.4 | Antikörper | 73 |
| 4.5 | Kits..... | 74 |
| 4.6 | Plasmide..... | 74 |
| 4.7 | cDNAs..... | 75 |
| 4.8 | Primer | 75 |
| 4.9 | Zellkulturmedien..... | 77 |
| 4.10 | Zelllinien..... | 77 |
| 4.11 | Medien für Bakterien | 78 |

| | |
|--|---------------|
| 4.12 Bakterien | 78 |
| 4.13 Puffer | 79 |
| 4.14 Mowiol | 81 |
| V. Methoden | 82 |
| 5.1 Molekularbiologische Methoden | 82 |
| 5.1.1 Tfb- und Hitzeschocktransformation | 82 |
| 5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien | 83 |
| 5.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren | 83 |
| 5.1.4 Präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA..... | 84 |
| 5.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel..... | 85 |
| 5.1.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen..... | 86 |
| 5.1.7 Ligation | 86 |
| 5.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 87 |
| 5.1.9 Quik Change Mutagenese | 89 |
| 5.2 Zellbiologische Methoden | 91 |
| 5.2.1 Passagieren von Zellen | 91 |
| 5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 92 |
| 5.2.3 Aussäen von Zellen auf 24- und 6-well-Vertiefungen..... | 92 |
| 5.2.4 Transfektion mittels Lipofectamin™ 2000 | 92 |
| 5.2.5 Transfektion mittels FuGENE HD | 93 |
| 5.3 Biochemische und immunologische Methoden | 94 |
| 5.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse..... | 94 |
| 5.3.2 Biotinylierung von Membranproteinen auf der Zelloberfläche | 95 |
| 5.3.3 Immunpräzipitation..... | 96 |
| 5.3.4 SDS-PAGE | 97 |
| 5.3.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose (<i>Semi-Dry-Blot</i>) | 99 |
| 5.3.6 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose | 100 |
| 5.3.7 Metabolische Markierung von Proteinen (<i>Pulse Chase</i>) | 100 |
| 5.3.8 Inhibitionsstudien | 101 |
| 5.3.9 Qualitativer Fusionsassay | 102 |

| | | |
|------------|--|------------------------------------|
| 5.3.10 | Overlay Fusionsassay | 102 |
| VI. | Literaturverzeichnis | 104 |
| VII | Anhang | 114 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 114 |
| | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis..... | 116 |
| | Sequenzen | 118 |
| | Publikationsliste | 126 |
| | Lebenslauf | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| | Verzeichnis der akademischen Lehrer..... | 129 |
| | Danksagung | 130 |
| | Ehrenwörtliche Erklärung | Fehler! Textmarke nicht definiert. |

Zusammenfassung

Henipaviren sind hochpathogene Paramyxoviren, von denen zurzeit nur zwei Vertreter bekanntermaßen Infektionen im Menschen oder Nutztieren verursachen können. Das Hendra-Virus kommt in Australien vor und verursacht vor allem respiratorische Infektionen in Pferden. Das Nipahvirus (NiV) stammt aus Südostasien, wo es regelmäßig kleinere Ausbrüche schwerer Enzephalitiden im Menschen verursacht. Generell sind Henipavirus-Infektionen zoonotische Infektionen, wobei fruchtfressende Flughunde der Gattung *Pteropus* das natürliche Reservoir darstellen. Bis vor wenigen Jahren ging man davon aus, dass die Verbreitung der Viren auf Südostasien und Australien beschränkt ist. Im Jahr 2009 gelang es jedoch in Afrika aus Flughunden der Gattung *Eidolon helvum* neue Henipavirus-ähnliche RNA-Sequenzen isolieren. Eines dieser neu entdeckten afrikanischen Henipaviren, GH-M74a (M74), konnte vollständig sequenziert und kloniert werden. Da es bis heute nicht möglich war, vermehrungsfähige Viren aus Flughunden zu isolieren, basiert die Einschätzung ihres zoonotischen Potentials zurzeit auf Funktionsanalysen einzelner viraler Proteine im Vergleich zu den homologen Proteinen humanpathogener Henipaviren. Aufgrund ihrer wichtigen funktionellen Bedeutung für eine erfolgreiche Infektion neuer Wirtszellen und die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle sollten in dieser Arbeit die beiden Oberflächen-Glykoproteine, das Rezeptor-bindende G und das Fusions-vermittelnde F-Protein, des neu entdeckten M74-Isolats funktionell charakterisiert werden. Hierfür wurden die M74-Glykoproteine zunächst in den Expressionsvektor pCAGGS kloniert. Um ihre Detektion zu ermöglichen wurden sie mit einem HA- bzw. Flag-tag versehen. Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz-Analysen wurde dann erst einmal nachgewiesen, dass alle klonierten Konstrukte exprimiert werden. Die Fähigkeit der beiden M74-Glykoproteine bei Koexpression Zell-Zell-Fusion zu vermitteln war allerdings gering und auf sehr wenige Zelllinien beschränkt. Ein Fusionsassay mit den heterotypischen NiV-G bzw. F-Proteinen ergab, dass der Hauptgrund für die geringe Fusionsaktivität im M74-F-Protein liegt. Anschließende Western Blot Analysen zeigten zwar eine mit dem NiV-F vergleichbar gute Gesamtexpression, M74-F wurde jedoch deutlich ineffektiver proteolytisch aktiviert und war kaum in fusionsaktiver Form auf der

Zelloberfläche nachweisbar. Koimmunfluoreszenzen mit dem NiV-F zeigten außerdem deutliche Unterschiede in der intrazellulären Verteilung der beiden Proteine. Darüber hinaus wiesen Inhibitionsstudien zwar auf eine Endozytose-abhängige Spaltung des M74-F hin, zeigten aber, dass das M74-F nicht durch die NiV-F aktivierenden endosomalen Proteasen Cathepsin B und L gespalten wird. Dies spricht eindeutig für unterschiedliche intrazelluläre Transportwege. Um zu klären, ob dieser veränderte Transport und die geringe Oberflächenexpression auf bestimmte Protein-Bereiche zurückzuführen sind, wurden im zweiten Teil der Arbeit verschiedene M74-F Chimären sowie Deletions- und Punktmutanten untersucht. Die Tatsache, dass mit keiner der eingebrachten größeren und kleineren Mutationen, die Funktionalität verbessert werden konnte, lässt vermuten, dass die im Vergleich zu anderen humanpathogenen Henipaviren geringere Oberflächenexpression und Fusionsaktivität des M74-F-Proteins, eine konservierte intrinsische Eigenschaft ist. Eine solch reduzierte Bioaktivität eines Fusionsproteins könnte durchaus einen Vorteil für ein Flughund-Henipavirus darstellen. So könnte eine zu starke Ausbreitung im Reservoir-Wirt vermieden werden, was eine langfristige Infektion und somit das „Überleben“ der Viren ermöglichen könnte. Eine solch reduzierte Aktivität würde darüber hinaus auch das zoonotische Potential eines afrikanischen Henipavirus stark einschränken.

Summary

Henipaviruses are highly pathogenic paramyxoviruses with two representatives that are known to cause infections in humans and livestock. Hendra virus occurs in Australia and mainly causes respiratory infections in horses. Nipah virus originated from Southeast Asia where it regularly causes smaller outbreaks of severe encephalitis in humans. In general, henipavirus infections are zoonotic infections with fruit bats (*Pteropus* spp.) serving as natural virus reservoir. It was believed earlier that the distribution of the viruses is restricted to Southeast Asia and Australia. But in 2009, henipavirus-like RNA sequences were isolated from *Eidolon helvum* bats in Africa. One of these newly discovered African henipaviruses, GH-M74a, could be fully sequenced and cloned. As isolation of replicative viruses from bats was not successful so far, evaluation of their zoonotic potential is based on functional analyses of individual viral proteins in comparison to their homologues from human pathogenic henipaviruses. Because of their importance for a successful infection of a new host cell and for virus spread from cell to cell, the two glycoproteins, the receptor-binding G and the fusion-mediating F protein, of the newly identified GH-M74a (M74) should be functionally characterized in this work.

For this purpose, the M74 glycoproteins were cloned into the expression vector pCAGGS. To facilitate their detection, they were marked with an HA- or Flag-tag. Indirect immunofluorescence analyses confirmed that all cloned constructs are expressed. The ability of the two M74-glycoproteins to cause cell-to-cell-fusion upon coexpression was limited and was restricted to very little cell lines. A fusion assay with heterotypic NiV-G or F-proteins revealed that the defect in fusion activity was mainly based on the F-protein. Subsequent western blot analyses showed that total expression comparable was comparable with NiV-F. However, proteolytic activation of M74-F was rather inefficient, and fusion-active forms were hardly detectable on the cell surface. Coimmunostainings with NiV-F furthermore showed clear differences in the intracellular distribution of the two proteins. In addition, inhibitor studies demonstrated an endocytosis-dependent cleavage of the M74-F but revealed that M74-F is not cleaved by the NiV-F activating proteases cathepsin B or L. This clearly indicates a different intracellular transport.

To clarify if the altered transport pathway and the reduced surface expression is caused by distinct protein domains, M74-F chimeric, deletion and point mutants were generated in the second part of this work. The fact that none of the introduced minor or major mutations could increase M74-F functionality suggests that the reduced surface expression and fusion activity of the M74-F protein is a conserved intrinsic feature. Such a reduced bioactivity of a fusion protein could be an advantage for a bat-henipavirus because it might limit the spread in the reservoir host. Thereby, long-lasting infections might be established that in turn might support the „survival“ of the virus. Such a reduced activity would also be expected to drastically limit the zoonotic potential of an African henipavirus.

I. Einleitung

1.1 Henipaviren

Henipaviren sind umhüllte Viren mit einem einzelsträngigen, nichtsegmentierten und in Negativstrang-Orientierung vorliegenden RNA-Genom. Sie gehören zur Familie der Paramyxoviridae und setzen sich aus dem Hendravirus (HeV), dem Nipahvirus (NiV) und dem neu identifizierten Cedarvirus (CedPV) zusammen (Wang et al., 2000; Marsh et al., 2012). Im Gegensatz zu anderen Paramyxoviren besitzen Henipaviren ein breites Wirtsspektrum. So können sie neben Schweinen, Pferden und Menschen auch Katzen, Hunde, Meerschweinchen, Hamster, Frettchen und Affen infizieren (Broder, 2012; Mungall et al., 2007; Parashar et al., 2000; Wong et al., 2003).

Tabelle 1: Vertreter der Henipaviren mit charakteristischen Eigenschaften.

| | Hendravirus | Nipahvirus | Cedarvirus |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------|
| Erstes Auftreten | 1994 | 1998 | 2009 |
| Verbreitung | Australien | Süd-Ost-Asien | Australien |
| Reservoir | Flughunde der Gattung <i>Pteropus</i> | | |
| Zwischenwirt | Pferd | Schwein | unbekannt |
| Pathogenität | Humanpathogen | Humanpathogen | Nicht-humanpathogen |

1.2 Henipavirus-Reservoir

Relativ kurz nach dem ersten NiV-Ausbruch 1998/99 konnten fruchtfressende Flughunde der Gattung *Pteropus* als natürliches Virusreservoir ausgemacht werden

(Yob et al., 2001; Chua et al., 2002). In diesen Flughunden kann das Virus replizieren ohne Krankheitssymptome hervorzurufen (Halpin et al., 2011). Die Flughunde können das Virus jedoch über Urin oder Speichel ausscheiden und so auch verbreiten (Middleton et al., 2007), da das Virus hierin mehrere Tage infektiös bleibt (Fogarty et al., 2008). Die genauen Gründe, warum Flughunde nicht an einer Henipavirus-Infektion erkranken sind noch nicht bekannt. Interessanterweise sind Flughunde nicht nur das Reservoir für Henipaviren, sondern auch für eine Vielzahl anderer hochpathogener Viren wie Ebola-, Marburg- und SARS-Coronaviren (Calisher et al., 2006). So ist z.B. die aktuelle Ebola-Epidemie vermutlich auf den Verzehr eines infizierten Flughundes durch einen 2-jährigen Jungen zurückzuführen (Baize et al., 2014).

Flughunde der Ordnung *Chiroptera* machen etwa 20% aller Säugetiere aus und gehören zu den ältesten Säugetieren auf der Erde (Nowak, 1994). Erste Untersuchungen ihres Immunsystems zeigten Unterschiede zu anderen Säugetieren und dem Menschen auf. So besitzen sie durch die Flugphasen regelmäßige Anstiege der Körpertemperatur auf Fieberniveau, was möglicherweise das Immunsystem dauerhaft aktiviert und Erkrankungen durch Virusinfektionen verhindert (O'Shea et al., 2014).

1.3 Hendravirus-Infektionen in Pferden und Menschen

1.3.1 Erster Ausbruch 1994

Im Jahr 1994 trat in Queensland Australien eine bisher unbekannte, tödlich verlaufende Krankheit in Pferden an zwei über 1000 km entfernten Orten auf. Einer dieser Orte war Hendra, ein Vorort der Stadt Brisbane. An dieser Krankheit erkrankten 21 Pferde, von denen 14 verstarben. Außerdem infizierten sich 2 Pferdetrainer, von denen einer verstarb (Murray et al., 1995). Es gelang, ein bis dato unbekanntes Virus als Auslöser für die fiebrige und respiratorische Erkrankung mit hoher Mortalität zu identifizieren (Field et al., 2000). Dieses wurde nach dem Ort des

ersten Ausbruchs Hendra benannt. Die exakte Übertragungsweise ist jedoch bis heute noch nicht eindeutig bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass Pferde sich durch HeV-kontaminierte Früchte oder Fäkalien von Flughunden infizierten (Hess et al., 2011).

1.3.2 Neuere Hendravirus-Ausbrüche

Nach dem ersten Ausbruch 1994 folgten bis Ende 2011 zu weiteren 32 registrierten HeV-Ausbrüchen (Broder et al., 2012). In den Jahren 2012 - 2014 kam es dann zu einer Reihe an Ausbrüchen, die diese Zahl auf 50 steigen ließen. Alle Infektionen mit HeV sind geographisch auf Australien begrenzt. Trotz der gehäuften Ausbrüche in Pferden, fand die Übertragung auf den Menschen nur in seltenen Fällen statt, da hierfür ein direkter Kontakt zwischen Mensch und Blut, Exkreten oder Sektionsmaterial der infizierten Tiere Voraussetzung war (Center for Disease Control and Prevention, 1999). Kam es trotzdem zu einer HeV-Infektion im Menschen, war die Mortalitätsrate auch hier sehr hoch: Von den bislang sieben infizierten Personen verstarben vier an Multiorganversagen (O'Sullivan et al., 1997). Bis heute gibt es keine Hinweise darauf, dass eine Übertragung von Mensch zu Mensch, oder von Mensch zu Pferd möglich ist. Auch der direkte Übertragungsweg von Flughunden auf Menschen konnte für HeV bisher nicht nachgewiesen werden (Selvey et al., 1995). Die Angst vor einer Hendravirus-Infektion führt inzwischen dazu, dass sich viele Veterinäre in Australien weigern, Pferde zu behandeln (Mendez et al., 2012).

1.3.3 HeV-Impfstoff

Im November 2012 gelang es, eine Zulassung für den Impfstoff Equivac® für Pferde zu erlangen. Es handelt sich um ein Spaltvakzin aus dem Oberflächenprotein G von HeV (<http://permits.apvma.gov.au/PER13510.PDF>). Ziel dieses Impfstoffes ist neben dem Schutz der Pferde auch die Unterbrechung des Übertragungsweges vom

Flughund über das Pferd auf den Menschen. Somit soll auch der Mensch geschützt werden (<http://www.horsecouncil.org.au/ahic/index.cfm/linkservid/BB3FF540-A272-9C2C-1835075CF6BC4A5B/showMeta/0/>). Bislang wurden keine Infektionen in geimpften Pferden berichtet, so dass man von einem effizienten Schutz durch die Equivac-Impfung ausgeht. Eine Zulassung für den Menschen z.B. Tierärzte, ist auf Grund der Zulassungsbestimmungen bisher nicht möglich (Middleton et al., 2014).

1.4 Nipahvirus-Infektionen in Schweinen und Menschen

1.4.1 Erster Ausbruch 1998/99

In Malaysia und Singapur kam es im Zeitraum von September 1998 bis Mai 1999 zu vermehrten Fällen von fiebrigen Enzephalitiden. Die Zahl der Erkrankten lag bei 276 Personen, wobei die Erkrankung bei 106 Personen tödlich verlief, was einer Mortalitätsrate von knapp 40 % entsprach (Chua et al., 2003). Als Erreger wurde anfangs das in der Region endemisch vorkommende Japanische Enzephalitis Virus vermutet. Auffallender Weise infizierten sich jedoch vornehmlich Schweinezüchter sowie Mitarbeiter in Schweineschlachtbetrieben, und es wurden zuvor auftretende respiratorische Erkrankungen in Schweinen berichtet (Mohd Nor et al., 2000, Chua et al., 2002). Auch erfolgte die Virusausbreitung entlang der Transportrouten der Schweine (Aziz et al., 1999; Chua et al., 2000; Wong et al., 2002a). Im März 1999 gelang es einen bis dato unbekannten Erreger aus dem Liquor eines erkrankten Patienten zu isolieren, der antigenische und molekulare Ähnlichkeiten zu dem 1994 in Australien identifizierten Hendravirus (HeV) zeigte (Chua et al., 2000; Wang et al., 2000). Das Virus wurde nach dem Wohnort des Patienten *Kampung Sungai Nipah village* benannt (Chua et al., 1999). Während des ersten NiV-Ausbruchs 1998 infizierten sich Schweine wohl über die Ausscheidungen von Flughunden auf angefressenen Früchten. Die zu dieser Zeit vorherrschende Anzahl großer Schweinemastbetriebe mit benachbarten Mangoplantagen bot dem Virus günstige Bedingungen für die Ausbreitung. Flughunde wurden durch die Früchte angelockt

und ließen angeknabberte und somit NiV-kontaminierte Früchte von Bäumen fallen, die dann für Schweine als Nahrung dienten (Middleton et al., 2002). Aufgrund der vielen auf engstem Raum gehaltenen Schweine konnte sich das Virus schnell innerhalb einer Farm ausbreiten (Middleton et al., 2002). Die hohe Reproduktionsrate der Zuchtschweine führte ebenfalls dazu, dass das Virus sich effizient weiter verbreiten konnte (Epstein et al., 2006). Die in Schweinen hervorgerufene akute, hochkontagiöse Atemwegserkrankung wird auch als Brüllhusten bezeichnet und besitzt eine geringe Mortalität aber eine hohe Morbidität (Chua et al., 2000; Mohd Nor et al., 2000). Der größte Anteil der NiV-Infektionen im Schwein verlaufen asymptomatisch. Trotzdem konnte das Virus im Respirationstrakt und im Urin nachgewiesen werden (Weingartl et al., 2005). Die Mehrzahl der infizierten Menschen hatte durch ihre Arbeit oder Lebensumstände direkten Kontakt zu Ausscheidungen infizierter Schweine oder Schlachtmaterial und nahmen das Virus vermutlich über den Respirationstrakt auf (Chua et al., 2000). Eine weitere Ausbreitung der Krankheit konnte 1998/99 nur durch die Keulung von über einer Million Schweinen in den betroffenen Regionen verhindert werden (CDC, 1999a, b). Seit Beendigung des ersten NiV-Ausbruchs in Malaysia wurde in dieser Region keine menschlichen Infektionen mehr beobachtet, obwohl das Virus in der Schweinepopulation sehr wohl noch endemisch ist (Center for Food Security and Public Health, 2007).

1.4.2 Jüngere Nipahvirus-Ausbrüche in Bangladesch

Seit 2001 kommt es regelmäßig zu kleineren NiV-Ausbrüchen in Bangladesch und Indien (Butler, 2004; Enserink, 2004). Hierbei spielen Kontakte von erkrankten Personen mit Schweinen keine Rolle, denn bei diesen Infektionen kam es zu einer direkten Übertragung des Virus vom Flughund auf den Menschen (Choi et al., 2004). Bei diesen Ausbrüchen kam/kommt es außerdem regelmäßig zu Mensch-zu-Mensch-Übertragungen. Die Mortalitätsrate einer Nipahenzephalitis ist mit ca. 60 % deutlich höher als während des ersten Ausbruchs in Malaysia von 1998/99 (Gurley et al., 2007).

Experimentelle Studien von Khan et al. unterstützen die Vermutung, dass der Verzehr von kontaminiertem Palmsaft für die Übertragung in Bangladesch verantwortlich ist. Infizierte Flughunde trinken nachts den austretenden Palmsaft und urinieren dabei oft in die aufgehängten Sammelbehälter (Khan et al., 2010; Rahmann et al., 2011). Dieser Palmsaft gilt als Delikatesse und wird am nächsten Tag roh konsumiert. Neueste experimentelle Studien konnten zeigen, dass Nipahviren in diesem Palmsaft bis zu 7 Tage hochinfektiös bleiben und Hamster sich durch das Trinken dieses virushaltigen Palmsaftes infizieren können (de Wit et al., 2014). Somit wurden die Aufklärung der Palmsaftverkäufer und das Anbringen von Schutzmatten an den Sammelstellen zu wichtigen Ansätzen der Präventionsarbeit.

1.4.3 Verlauf einer NiV-Infektion im Menschen

Nach der Übertragung auf den Menschen beträgt die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Krankheit wenige Tage bis zwei Wochen (Chong et al., 2001). Erste Anzeichen der Krankheit werden als grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen oder Schwindelgefühle beschrieben. Später können sich daraus jedoch akute Enzephalitiden entwickeln, die teilweise zum Koma führen (Chua et al., 1999). Klinische Anzeichen einer neurologischen Erkrankung beinhalten segmentale Myoklonien, Areflexien und Hypertonien sowie Hypotonien und Tachykardien (Tan et al., 2003). Patienten, die NiV-bedingte akute Enzephalitiden überlebt haben, behalten in 15 % der Fälle bleibende neurologische Schäden (Tan et al., 2002). Überlebende erleiden zudem Spätfolgen, die zu Depressionen, Epilepsien oder Veränderungen der Persönlichkeit führen können (Sejvar et al., 2007). Zudem konnte festgestellt werden, dass einige Patienten an erneut auftretenden Enzephalitiden (*relapse*) erkrankten oder Patienten mit symptomlosem Krankheitsverlauf sogenannte *Late-onset* Enzephalitiden entwickelten (Tan et al., 2002; Wong et al., 2002b). Diese beiden Beobachtungen sprechen für eine Viruspersistenz im ZNS. Im Durchschnitt vergingen 8,4 Monate zwischen Ersterkrankung und Wiederausbruch. Auf Basis umfangreicher histopathologischer Untersuchungen und Studien in einem

Hamstermodell (de Wit et al., 2011) wurde das folgende Modell zur Virusausbreitung und zum Krankheitsverlauf aufgestellt:

Nach der Virusaufnahme über Tröpfchen und eventuell Aerosole findet im Respirationstrakt die erste Replikation des Virus statt. Darauf folgen eine Virämie und eine systemische Infektion von Endothelzellen kleinerer und mittlerer Gefäße. Dabei sind Organe wie Herz, Lunge und Nieren betroffen, jedoch findet man die stärkste Ausprägung im ZNS. Die Infektion mikrovaskulärer Hirnendothelzellen führt zu einer starken Entzündungsreaktion, die ursächlich für die klinische multifokale Enzephalitis ist. Neben der deutlichen Vaskulitis kommt es auch zu einer Fusion von Endothelzellen zu mehrkernigen Riesenzellen (Synzytien), wie sie für Paramyxoviren typisch ist. Lösen sich diese Riesenzellen aus dem Zellverband können sie zusätzlich Thrombosen verursachen (Chua et al., 2000). Während einer NiV-Infektion kommt es zunächst zu einer Zytokinausschüttung. Hier scheinen die beiden Mediatoren IP10 und MCP-1 wichtig zu sein (Valbuena et al., 2014). Später entwickelt das adaptive Immunsystem zunächst IgM- und später IgG-Antikörper. Diese wirken neutralisierend gegen die beiden viralen Oberflächenproteine F und G, da sie die Bindung und Fusion mit nichtinfizierten Nachbarzellen verhindern und so die Virusausbreitung blockieren (Tamin et al., 2002). Diese Antikörper lassen sich über einen ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) aus dem Serum oder dem Liquor von Infizierten nachweisen.

1.5 Henipavirus-Impfstoffe und Therapien für Menschen

Bis zum heutigen Tage gibt es für den Menschen weder einen zugelassenen Impfstoff noch eine spezifische antivirale Therapie gegen eine Infektion mit Henipaviren. Die experimentelle Behandlung infizierter Tiere (z.B. Grüner Meerkatzen) mit Ribavirin führt zu kontroversen Resultaten. In der Studie von Chong et al. konnte durch Ribavirinegabe das Mortalitätsrisiko um 36 % gesenkt werden, Rockx et al. konnten lediglich die Lebenszeit verlängern, jedoch kein Tier heilen

(Chong et al., 2001; Rockx et al., 2010). Vielversprechender scheinen Studien bezüglich einer möglichen Impfung. So ist es gelungen, einen neutralisierenden, humanen, monoklonalen Antikörper zu klonieren, der gegen die Rezeptor-bindende Domäne des Glykoprotein G von NiV und HeV gerichtet ist. Die Wirksamkeit dieses Antikörpers als passive Immunisierung konnte sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Frettchen-Modellen bestätigt werden (Bossart et al., 2009). Ferner war es möglich, durch die Antikörpergabe die Virusreplikation in Schweinen zu reduzieren. Der aktuell vielversprechendste Ansatz ist die Behandlung mit einem humanen monoklonalen Antikörper (m102.4). Durch zweifache Gabe nach einer NiV-Infektion mit tödlichen Dosis überlebten alle 12 *African green monkeys*, selbst, wenn die erste Antikörpergabe erst 5 Tage nach der Infektion erfolgte (Geisbert et al., 2014). Dies ist somit die erste und einzige erfolgreiche Post-Expositionstherapie bei einer Henipavirus-Infektion.

Eine aktive/passive Impfung wie oben beschrieben, mit einer rekombinanten Canarypox-Vakzine, die sowohl das NiV-G als auch F Protein exprimiert, zeigte in Schweinen einen Schutz von einer Ansteckung mit NiV und nach erfolgter Infektion eine Minimierung der Virusausbreitung über die Schleimhäute (Weingartl et al., 2006). In einer aktuellen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass eine aktive Immunisierung mit einem Adenovirus-assoziiertem Vektor, der das NiV-Glykoprotein G exprimiert, eine schützende und langanhaltende Immunantwort hervorruft. Mit dieser NiV-Vakzinierung wurde sogar eine Kreuzimmunität mit HeV beobachtet (Ploquin et al., 2013).

1.6 Das afrikanische Henipavirus GH-M74a

1.6.1 Die Entdeckung neuer Paramyxoviren

Da Henipaviren bisher nur aus Flughunden der Gattung *Pteropus* isoliert werden konnten, war man davon ausgegangen, dass die Ausbreitung dieser Viren von der geographischen Verbreitung der Flughunde abhängt und somit auf den Raum

Australien und Südostasien beschränkt ist (Hayman et al., 2008). Neuere Studien zeigen jedoch, dass Henipaviren einen viel größeren geografischen Verbreitungsraum haben und auch in Afrika vorkommen (Abb. 1.1). Auf dem afrikanischen Kontinent gibt es zwar keine Flughunde der Gattung *Pteropus*, dafür ist der Palmenflughund (*Eidolon helvum*) weit verbreitet. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Drosten aus Bonn hat in *Eidolon*-Arten in Ghana eine Vielzahl Henipavirus-ähnlicher RNA-Sequenzen gefunden (Drexler et al., 2009). Besonders interessant hierbei ist, dass es sich bei *E. helvum* um fruchtfressende Flughunde handelt, die ausschließlich in Afrika sowie im Nahen Osten leben (O'Brien, 2011). Im asiatischen Raum sind sie nicht beheimatet. Diese neuen Entdeckungen geben Hinweise auf eine bisher unterschätzte, großflächige geographische Ausbreitung der Henipaviren (Drexler et al., 2009).

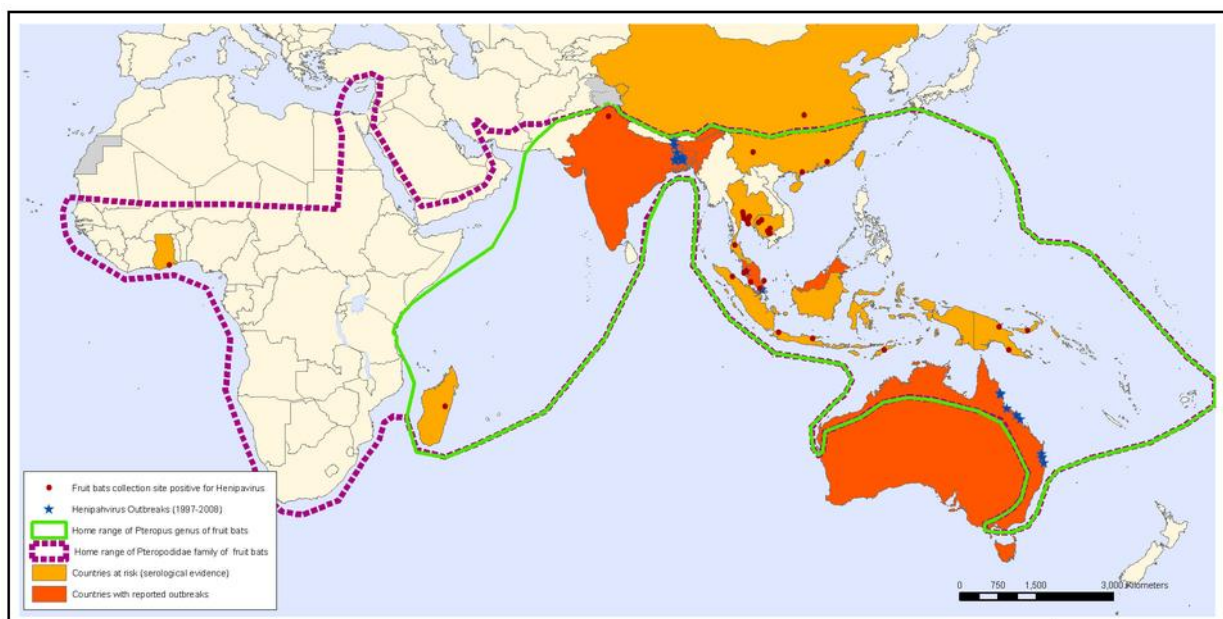


Abb. 1.1: Geographische Verbreitung der Henipavirus-Ausbrüche sowie der Flughunde der Familie *Pteropodidae*. Die roten Punkte weisen auf die Fundorte der Henipavirus-positiven fruchtfressenden Flughunde hin. Die blauen Sterne zeigen die Orte, an denen Ausbrüche von Henipavirus-Infektionen in den Jahren 1997-2008 stattfanden. Quelle: http://www.who.int/csr/disease/nipah/Global_NiphaandHendraRisk_20090510.png

E. helvum gehört zur Familie der *Pteropodidae* und ist der zweitgrößte Flughund auf dem afrikanischen Kontinent. Tagsüber halten sich die Flughunde sowohl in Höhlen als auch in großen Bäumen auf (vgl. Abb. 1.2). Dabei leben sie in sehr großen Gruppen von bis zu 1.000.000 Tieren. Sobald die Dämmerung beginnt, begeben sich

die Flughunde auf Nahrungssuche. Hauptsächlich ernähren sie sich von Früchten, Nektar, Pollen oder auch Blättern (DeFrees und Wilson, 1988). Die Tiere selbst wiederum werden auch regelmäßig gejagt und anschließend als proteinreiche Nahrung auf afrikanischen Märkten als so genanntes *bushmeat* angeboten (Drexler et al., 2009).



Abb. 1.2: Eine Flughundekolonie der Gattung *Eidolon helvum* „Zoologischen Garten“ in Kumasi, Ghana. Die Proben für die serologischen Untersuchungen der Flughunde wurden hier entnommen. Quelle: Drexler et al. 2009.

Für eine groß angelegte Untersuchung der afrikanischen *E. helvum* Kolonien in Ghana wurden unter den Bäumen, in denen sich die Flughunde aufhielten, Plastikfolien ausgebreitet, um Ausscheidungen („droppings“) der 400.000 Tiere über fünf Tage hinweg aufzufangen und zu sammeln. Zusätzlich zu den Kot- und Urinproben wurden Tiere eingefangen und Blut-, Speichel- sowie Organproben entnommen. Die eingefangenen Tiere wurden mit dem Narkosemittel Ketamin eingeschläfert. Danach wurden Mundhöhlenabstriche gemacht, sowie Blutproben und die Organe entnommen. 30 mg des entsprechenden Gewebes wurden

homogenisiert (TissueLyser, Qiagen). Aus allen gesammelten Proben („droppings“, Blut, Organe) wurde anschließend RNA mit Hilfe eines RNeasy Kits (Qiagen) extrahiert. Diese RNA wurde dann mit dem Superscript III OneStep RT-PCR Kit (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden Primer verwendet, die in den konservierten Regionen des L-Gens von Henipaviren binden. Die so entstandenen 496 bp langen cDNA-Fragmente des L Gens wurden mittels *Next Generation Sequencing (Pyrosequencing 454)* analysiert (Drexler et al., 2012). Die erhaltenen Sequenzen zeigten bei einem Abgleich mit dem phylogenetischen Stammbaum der Familie der *Paramyxoviridae* eine hohe Übereinstimmung mit den Domänen I und II des Polymerase-Gens L der Henipaviren (Nukleotide 12508-13067 des NiV). Auf diese Weise wurden dem Genus Henipavirus 19 neue Virusspezies zugeordnet (Drexler et al., 2012) (siehe Abb. 1.3). An oberster Stelle ist das Isolat GH-M74a (BatPV/Eid_hel/GH-M74a/GHA/2009) zu finden, das sich im phylogenetischen Stammbaum relativ weit entfernt von den bisher bekannten Nipah- und Hendraviren befindet (in Abb. 1.3 in schwarz gezeigt). Diese RNA wurde 2009 isoliert und ist bislang als einziges afrikanisches Henipavirus vollständig sequenziert und kloniert.

Alle Versuche, lebendes Virus direkt aus den Proben zu isolieren waren bisher leider nicht erfolgreich. Es war weder möglich einen zytopathischen Effekt auf Vero- oder Caco2-Zellen, noch ein Viruswachstum mittels RT-PCR nachzuweisen (Drexler et al., 2009). Aus dem Grund können Aussagen über das pathogenetische Potential der afrikanischen Henipaviren nicht über Infektionsstudien gewonnen werden. Funktionelle Untersuchung viraler Proteine, wie die in dieser Arbeit vorgestellten Analysen, sind zur Zeit die einzige Möglichkeit, Einschätzungen über den Wirtstropismus oder die Vermehrungsfähigkeit in humanen Zellen zu gewinnen.



Drexler et al., 2012.

Genomanalyse von GH-M74a

kb (*islet amplicons*) generiert und mit Hilfe einer „*primer walking*“ Prozedur sequenziert. Die 5' und 3' Enden der genomischen RNA wurden durch die *RACE*-Methode (*rapid amplification of cDNA ends*) bestimmt. Die cDNA für die beiden Glykoproteine F und G wurden uns zur Verfügung gestellt.

vergleichbaren Genomlänge, sowie vergleichbar langer intergenischer,

untranslatierter Bereiche konnte GH-M74a nun definitiv dem Genus *Henipavirus* zugeordnet werden. Weiter zeigt GH-M74a zusätzliche Henipavirus-Charakteristika. So besitzt es, wie NiV und HeV, neben einer monobasischen Spaltstelle (PGNAR/FAG) auch ein Endozytosesignal (YTPL) im putativen Fusionsprotein (Drexler et al., 2012).

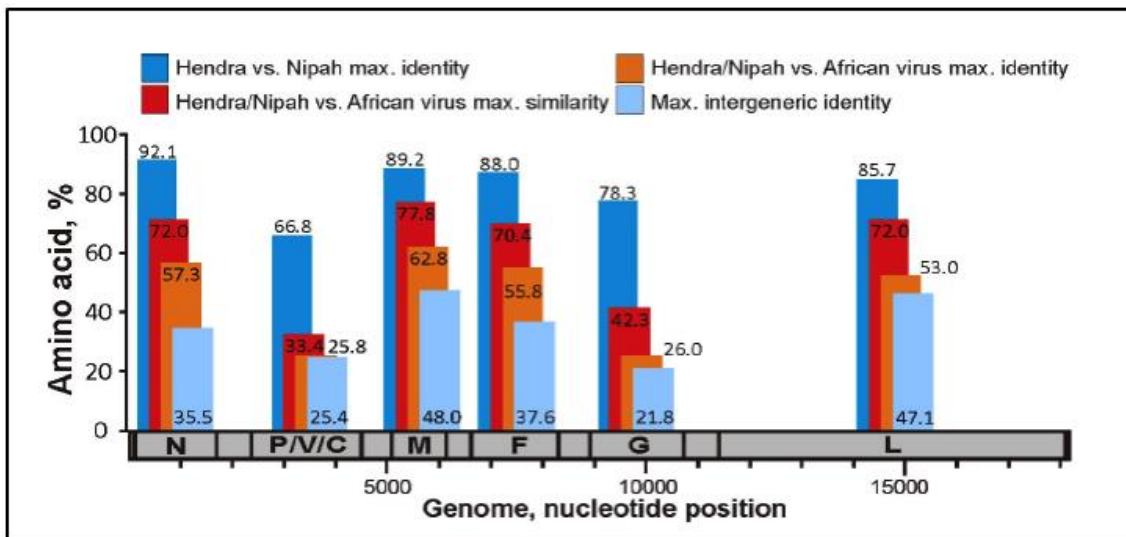


Abb. 1.4: Genomstruktur und Aminosäurevergleich der einzelnen Gene zwischen Hendra, Nipah sowie dem neu isolierten GH-M74a. Quelle: Drexler et al., 2012.

Abbildung 1.4 zeigt einen detaillierten Vergleich der Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Gene. Die Übereinstimmung zwischen HeV und NiV sowie zwischen GH-M74a und HeV/NiV ist hier graphisch in blau und orange dargestellt. Die Aminosäuresequenz des F-Proteins des neu klonierten afrikanischen Virus stimmt mit der Sequenz von HeV- und NiV-F zu 55,8 % und die des GH-M74a-G-Proteins nur zu 26 % überein. Vergleicht man die Sequenz der Aminosäuren des F- oder G-Proteins von HeV und NiV, so liegt die Homologie mit 88 % bzw. 78,3 % deutlich höher. Dies ist ein Indiz dafür, dass das GH-M74a nur entfernt mit den südostasiatischen Henipaviren verwandt ist.

1.7 Henipavirus-Glykoproteine

1.7.1 Virusaufbau

NiV und HeV sind umhüllte, pleomorphe Viren mit einer zwischen 40 und 600 nm variierenden Größe (Hyatt et al., 2001). In die von der Wirtszelle abstammende Hüllmembran sind die beiden Oberflächenglykoproteine, das Rezeptor-bindende Glykoprotein (G) und das Fusionsprotein (F) integriert (Abb. 1.5). Die Innenseite der Virushülle wird von dem Matrixprotein (M) ausgekleidet, welches auch mit dem innerhalb des Virion liegenden, helikalen Nukleokapsid interagiert. Im Inneren des Partikels befindet sich das in negativer Orientierung vorliegende, einzelsträngige und nichtsegmentierte RNA-Genom. Zusammen mit der Polymerase (L), dem Nukleoprotein (N) und dem Phosphoprotein (P) bildet die virale RNA das Nukleokapsid.

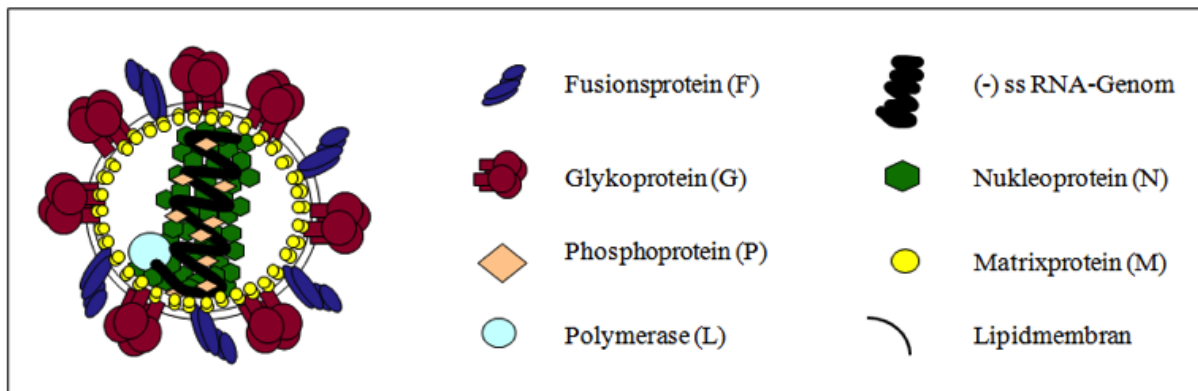


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Henipaviren. Modifiziert nach Diederich, 2007.

1.7.2 Glykoprotein G

Das Glykoprotein G ist eines der beiden Oberflächenproteine der Henipaviren. Es ist ein Typ-II-Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 78 kDa und einer Länge von 602 (NiV-G) bzw. 604 (HeV-G) Aminosäuren (Xu et al., 2008, Wang et al., 2001). Die Charakteristika des G-Proteins sind im Folgenden beispielhaft für das NiV-G beschrieben. NiV-G enthält sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen und ist aus drei Proteindomänen aufgebaut (Harcourt et al., 2000): Am N-Terminus liegt die aus 45 Aminosäuren bestehende zytoplasmatische Domäne, gefolgt von einer

hydrophoben Transmembrandomäne, welche für die Verankerung des Proteins in die Virushülle bzw. in der Plasmamembran verantwortlich ist. Am C-Terminus befindet sich nach einer kurzen extrazellulären Stielregion die große globuläre Ektodomäne (Abb.1.6). Das G-Protein weist strukturelle Ähnlichkeit zu anderen paramyxoviralen Rezeptor-bindenden Proteinen auf. So bildet es über intermolekulare Disulfidbrücken nahe der Transmembranregion Homodimere, wobei im Viruspartikel und auf der Oberfläche infizierter Zellen vermutlich immer zwei Dimere zu einem Tetramer assoziiert sind (Bowden et al., 2008; Maar et al., 2012). Im Gegensatz zu den Rezeptor-bindenden Proteinen Hämagglutinin (H) und Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) anderer Paramyxoviren besitzt das G-Protein weder eine hämagglutinierende noch eine Neuraminidase-Aktivität (Wang et al., 2001). Das G-Protein aller Henipaviren ist für die spezifische Adsorption des Virus an seinen zellulären Rezeptor EphrinB2/B3 auf der Zellmembran verantwortlich (Bonaparte et al., 2005). Zusammen mit dem Fusionsprotein F vermittelt es die Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran sowie die Zell-Zell-Fusion infizierter Zellen mit deren Nachbarzellen (Bossart et al., 2002). Die für Bindung und Fusion entscheidenden Aminosäuren befinden sich vermutlich zwischen Position 504 und 533 am C-terminalen Ende der Ektodomäne (Guillaume et al., 2006b). In der zytoplasmatischen Domäne befinden sich ein Dityrosin- sowie ein Dileucin-Motiv an Aminosäureposition 28/29 bzw. 41/42, die Homologien zu klassischen Endozytosesignalen haben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das G-Protein wahrscheinlich nicht aktiv endozytiert, sondern während des normalen Umsatzes der Plasmamembran (*turnover*) passiv internalisiert wird (Vogt, 2005).

Im Vergleich zum NiV-G ist das GH-M74a-G 30 Aminosäuren länger und besitzt 11 statt 7 potentielle N-Glykosylierungsstellen (Abb. 1.6).

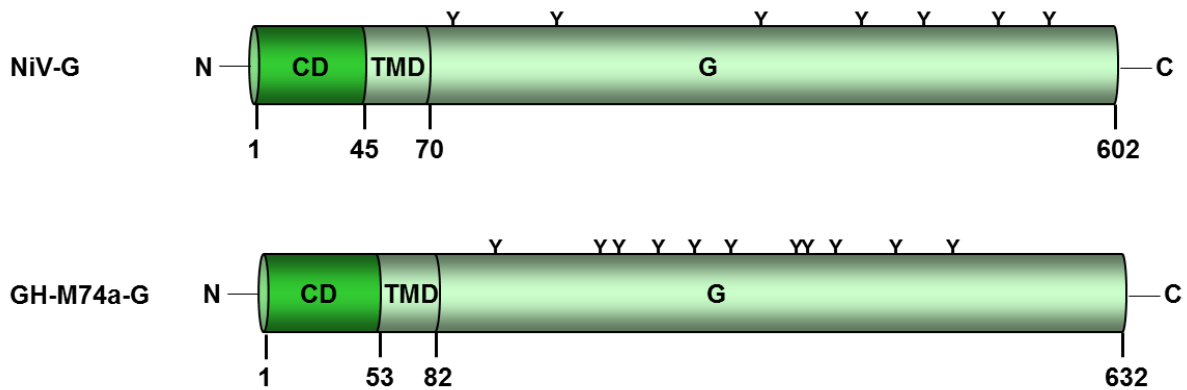


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Glykoprotein G von NiV und GH-M74a. CD: Zytoplasmatische Domäne, TMD: Transmembrandomäne, Y: potentielle N-Glykosylierungsstellen

1.7.3 Fusionsprotein F

Der Aufbau henipaviraler Fusionsproteine ist im Folgenden wieder beispielhaft für das NiV-F beschrieben. Das Fusionsprotein F von NiV (Abb. 1.7) hat eine Länge von 546 Aminosäuren und weist ein molekulares Gewicht von 69 kDa auf. Wie auch andere paramyxovirale F-Proteine handelt es sich um ein Typ-I-Membranprotein mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne von 30 Aminosäuren, welches als Vorläuferprotein F_0 synthetisiert und im Endoplasmatischen Retikulum (ER) glykosyliert wird (Harcourt et al., 2000; Wang et al., 2001). Auf der Oberfläche von Viruspartikeln und infizierten Zellen findet man die F-Proteine in Form von Homotrimeren (Eaton et al., 2004). Das inaktive F_0 -Vorläuferprotein muss durch proteolytische Spaltung am R^{109} in die über Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten F_1 und F_2 gespalten werden. Damit wird das Fusionspeptid am N-Terminus der F_1 -Untereinheit freigelegt und das F-Protein ist somit biologisch aktiv (Moll et al., 2004). Das Fusionspeptid besteht aus einer Folge von etwa 20 hydrophoben Aminosäuren und ist innerhalb der Paramyxoviren hoch konserviert, da es essenziell für die Insertion in die Zielmembran und die darauf folgende Einleitung des Fusionsprozesses ist (Epand, 2003). Im Gegensatz zu anderen systemisch replizierenden Viren besitzt das NiV-Fusionsprotein eine monobasische Spaltstelle in Form eines Aginins an Position 109 (R^{109}) (Moll et al., 2004). Im Kontrast zu anderen Paramyxoviren sind hier keine Trypsin-ähnliche Proteasen für die Spaltung

zuständig, sondern die Cathepsine B und L (Diederich et al., 2009, Diederich et al., 2012). Am C-Terminus des F-Proteins befindet sich die zytoplasmatische Domäne aus 28 Aminosäuren, die für den Transport des Proteins innerhalb der Zelle wichtige Sequenzen trägt (Harcourt et al., 2000; Vogt et al., 2005; Weise et al., 2010). Am wichtigsten ist hier das Endozytosesignal (YSRL) in der zytoplasmatischen Domäne an Position 525-528. Durch dieses wird das NiV-F-Protein durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen. Erst im endosomalen Kompartiment wird F₀ dann durch die Aktivierungsproteasen Cathepsin L oder Cathepsin B in die aktiven Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten. Anschließend wird das gespaltene und aktive F-Protein zurück zur Zelloberfläche transportiert und in neu entstehende Virionen eingebaut (Vogt et al., 2005; Diederich et al., 2005; Pager et al., 2006; Diederich et al., 2008).

Im Vergleich zum NiV-F ist die Sequenz des GH-M74a-F 115 Aminosäuren länger. Der Größenunterschied beruht vor allem auf den langen Abstand des Startcodons zum Signalpeptid in der F₂-Untereinheit (pre-SP Sequenz)(Abb. 1.7).

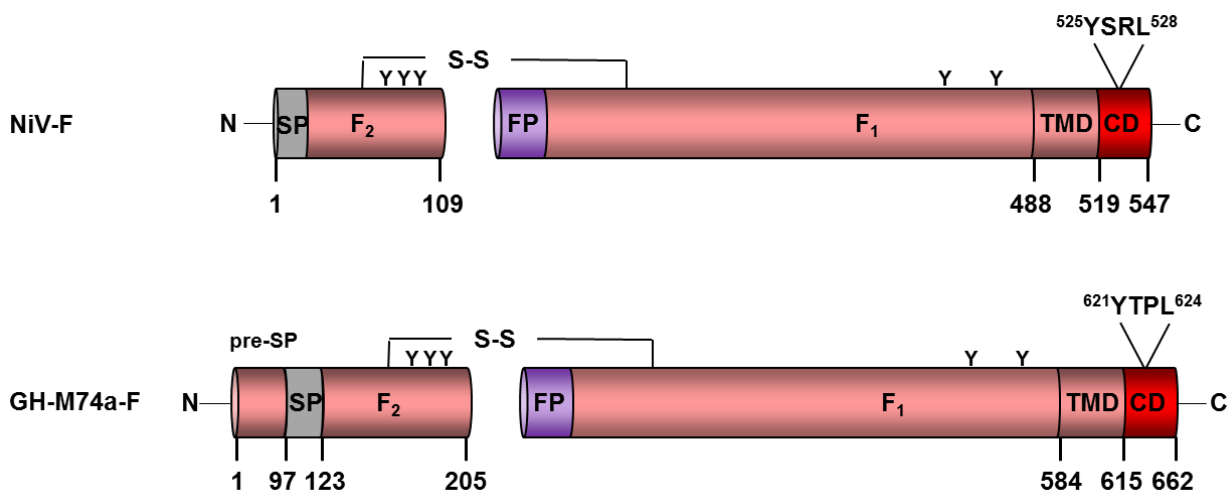


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Fusionsproteins F von NiV und GH-M74a. Nach Spaltung an Position 109 bzw. 205 sind die beiden Untereinheiten F₂ und F₁ durch eine Disulfidbrücke (S-S) miteinander verbunden. SP: Signalpeptid, FP: Fusionspeptid, TMD: Transmembrandomäne, CD: Zytoplasmatische Domäne, Y: potentielle N-Glykosylierungsstellen, YSRL: Endozytosesignal

Neben der Vermittlung der pH-unabhängigen Fusion der Virushülle mit der Zellmembran beim Viruseintritt ist das gespaltene F-Protein zusammen mit dem G-Protein entscheidend für einen weiteren Fusionsprozess: Die Zell-Zell-Fusion infizierter Zellen mit Rezeptor-tragenden benachbarten Zellen (Lamb and Kolakofsky, 2001). So kann eine Ausbreitung der Infektion auch ohne Virusfreisetzung erfolgen. *In vitro* führt das in der Regel zu einer Bildung von mehrkernigen Riesenzellen sogenannte Synzytien (Bossart et al., 2002; Tamin et al., 2002). Für beide Fusionsprozesse (Virus-Zell-Fusion und Zell-Zell-Fusion) ist das Zusammenspiel mit dem G-Protein und dessen Bindung an seinen zellulären Rezeptor EphrinB2 oder EphrinB3 essentiell. Erst nach Bindung des G-Proteins an seinen Rezeptor unterläuft dieses einer Konformationsänderung, die wiederum eine Konformationsänderung im gespaltenen F-Protein aktiviert, wodurch sich das stark hydrophobe Fusionspeptid am N-Terminus der F₁-Untereinheit umlagert und an die Proteinoberfläche gelangt. Erst dann kann sich das Fusionspeptid in die Zielmembran einlagern. In der F₁-Untereinheit befinden sich zwei α -helikale Domänen, die als *heptad repeats* bezeichnet werden. Diese *heptad repeats* eines F-Trimers interagieren kurz nach dem Fusionsprozess miteinander und es entsteht ein für Paramyxovirus F-Proteine typisches *coiled-coil* Bündel aus sechs Helices. Dieses „klappt nach außen weg“, so dass beide Membranen miteinander verschmelzen können (Chang und Dutch, 2012). Zell-Zell-Fusion und Synzytienbildung ist übrigens nicht nur in NiV-infizierten Zellen zu beobachten, sondern auch *in vitro* in Zellen, die nur das F- und G-Protein koexprimieren.

1.7.4 Rolle der henipaviralen Glykoproteine im Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Henipaviren beginnt mit der spezifischen Bindung des Glykoprotein G an die zellulären Oberflächenproteine EphrinB2/B3 (siehe Abb. 1.8). Durch diese Bindung erfährt das Glykoprotein G eine Konformationsänderung, die anschließend beim Fusionsprotein F zu einer Konformationsänderung führt. Da das G-Protein die Konformationsänderung des F-Proteins induziert, spricht man von einer Fusions-Helferfunktion (*fusion helper function*) des G-Proteins. Nach

Einlagerung des hydrophoben Fusionspeptids am N-Terminus der F₁-Untereinheit in die Zielzellmembran folgt die pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Wirtszelle, sodass das Nukleokapsid ins Zytoplasma entlassen werden kann, wo alle folgenden Replikationsschritte stattfinden (Tamin et al., 2002).

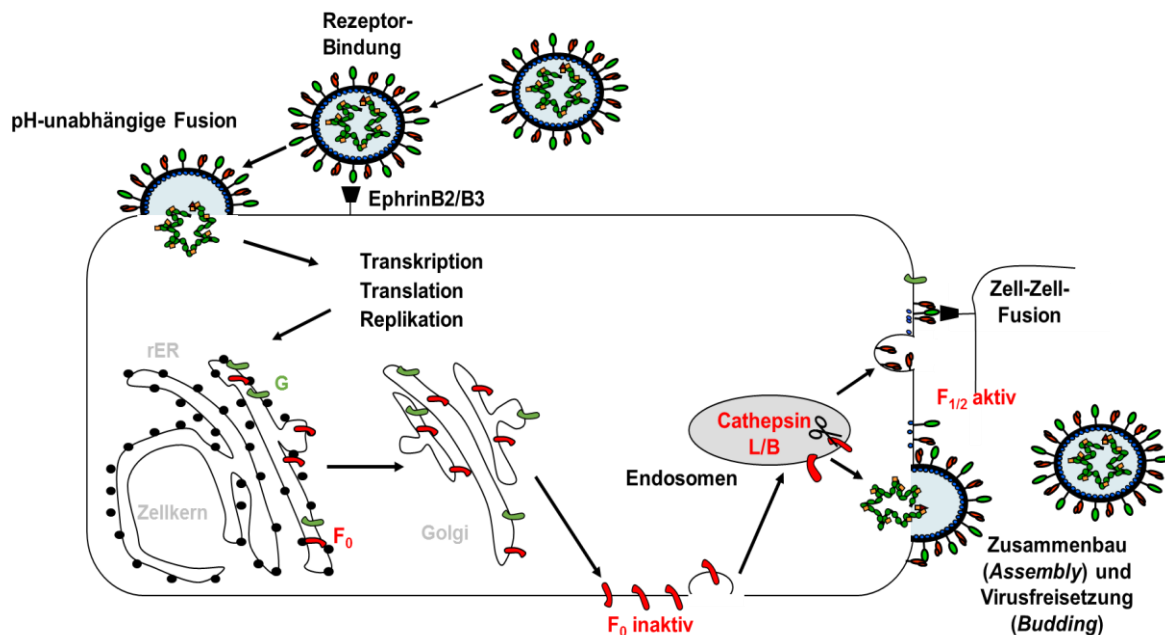


Abb. 1.8: Rolle des G- und F-Proteins im Replikationszyklus (modifiziert nach Diederich, 2007).

Nach erfolgreicher Infektion einer Zelle finden im Zytoplasma alle wichtigen Schritte der viralen Transkription und Replikation statt (Modrow, 2003). Die Synthese der Proteine N, P, M und L erfolgt an freien Ribosomen im Zytoplasma der Wirtszelle, während die Glykoproteine F und G an Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert werden. Auf ihrem Transportweg vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran werden die Glykoproteine F und G prozessiert. Das F-Protein erreicht in seiner inaktiven F₀-Form die Zelloberfläche und wird, wie bereits beschrieben, durch Clathrin-vermittelte Endozytose wieder aufgenommen und im endosomalen Kompartiment durch Cathepsin L oder B proteolytisch aktiviert (Vogt et al., 2005; Diederich et al., 2005; Pager and Dutch, 2005; Pager et al., 2006, Diederich et al., 2012). Nach dieser Aktivierungssplattung gelangt das F-Protein über Recycling-Endosomen erneut an die Zelloberfläche (Diederich et al., 2012) und kann

hier zusammen mit dem G-Protein die Zell-Zell-Fusion mit benachbarten Zellen vermitteln oder in neue Virionen eingebaut werden.

1.8 Henipavirus-Rezeptoren: EphrinB2/B3

Die Identifikation der EphrinB2-Liganden als Rezeptoren für Henipaviren im Jahr 2005 gelang unabhängig voneinander gleich zwei Gruppen. Von Bonaparte et al. wurde der Rezeptor für Henipaviren über Microarray-Analysen ermittelt. Dafür wurde die Genexpression verschiedener HeV- und NiV-permissiver und nicht-permissiver Zellen miteinander verglichen und gezielt nach Membranproteinen gesucht, die ausschließlich in permissiven Zellen exprimiert wurden. Aus den so gefundenen Kandidaten war EphrinB2 das einzige Protein, das nach Transfektion in nicht-permissive HeLa-USU Zellen eine NiV-Infektion ermöglichen konnte (Bonaparte et al., 2005). Negrete et al. konnten mit Hilfe von Immunpräzipitations-Analysen ebenfalls EphrinB2 als henipaviralen Rezeptor identifizieren. Hier gelang es mit einem Fc-markierten löslichen NiV-G-Protein aus NiV-permissiven 293T Zellen eine 48 kDa Proteinbande zu präzipitieren, die in nicht-permissiven CHO-pgsA745 Zellen nicht vorhanden war. Diese 48 kDa Bande konnte anschließend als EphrinB2 identifiziert werden (Negrete et al., 2005). Wenig später wurde mit ähnlichen Immunpräzipitations-Analysen auch EphrinB3 als weiterer Rezeptor für NiV identifiziert. Die Bindung von NiV-G an EphrinB3 war im Vergleich zu EphrinB2 jedoch deutlich schwächer (Negrete et al., 2006). Die Autoren schlagen vor, dass in Regionen, in denen sowohl EphrinB2 als auch B3 exprimiert werden, wie beispielsweise dem *Cerebralen Cortex* und *Hippocampus*, beide Proteine als Rezeptor für NiV wirken könnten, während EphrinB3 in Regionen, die kein EphrinB2 tragen, wie im *Corpus Callosum* und dem Rückenmark, für die Virusausbreitung verantwortlich sein könnte (Negrete et al., 2006; 2007).

Ephrine sind innerhalb aller Säugetierspezies sehr hoch konserviert (Tab 1.2) was sicher einer der Gründe für das breite Wirtsspektrum von Henipaviren ist.

Tabelle 2: Homologie der EphrinB2 und B3 DNA- und Aminosäuresequenzen in verschiedenen Spezies.
Der Vergleich bezieht sich auf die humanen Sequenzen, Angaben in Prozent. Nach Bossart et al., 2007.

| | EphrinB2 | | EphrinB3 | |
|--------------------------|----------|------------|----------|------------|
| | DNA | Aminosäure | DNA | Aminosäure |
| Mensch | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Pferd | 95 | 96 | 95 | 98 |
| Schwein | 95 | 96 | 95 | 97 |
| Katze | 94 | 96 | 93 | 97 |
| Hund | 93 | 96 | 95 | 97 |
| <i>P.alecto</i> | 94 | 95 | 94 | 97 |
| <i>P.vampyrus</i> | 94 | 95 | 94 | 97 |
| Maus | 91 | 96 | 91 | 95 |

1.9 Henipavirus-Aktivierungsproteasen: Cathepsin B und L

Innerhalb von Endosomen sind eine Vielzahl an Proteasen aktiv. Proteasen sind Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren und anhand ihres katalytischen Zentrums in Aspartat-, Cystein-, Serin- oder Metalloproteasen klassifiziert werden (Barrett, 1994). Der Großteil der lysosomalen Proteasen sind Cysteinproteasen mit den Cathepsinen als größte Untergruppe (McGrath, 1999). Lange wurde vermutet, dass der unspezifische proteolytische Abbau von Proteinen in Lysosomen die einzige Aufgabe der Cathepsine sei. Doch ist inzwischen bekannt, dass diese auch spezifische Funktionen in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen besitzen und ihre Wirkung nicht auf lysosomale Kompartimente beschränkt ist (Turk et al., 2012). Für einige Viren sind bereits wichtige Funktionen von Cathepsinen in der Infektion bekannt. Bei Ebolaviren unterstützt eine Cathepsin-vermittelte GP-Spaltung den Viruseintritt (Gnirss et al., 2012; Schornberg, 2006). Auch das *Spike*-Protein des SARS-Coronavirus muss wahrscheinlich durch Cathepsine gespalten

werden um seine Fusionsaktivität zu erlangen (Bosch et al., 2008; Simmons et al., 2006).

Für Henipaviren werden Cathepsine nicht für den Viruseintritt benötigt (Diederich et al., 2008). Allerdings sind die Cathepsine unerlässlich für die pH-abhängige F-Aktivierungsspaltung in den Endosomen. Je nach Expressionsprofil der Zelle ist dabei Cathepsin B oder L verantwortlich (Pager und Dutch, 2005; Diederich et al., 2012). Aufgrund der Aktivierung der Henipavirus-Fusionsproteine bereits vor dem Einbau in neue Viren werden diese als infektiöse Partikel freigelassen und benötigen keine weitere Cathepsin-Spaltung beim Viruseintritt in eine neue Zielzelle (Diederich et al., 2008).

1.10 Aufgabenstellung

Phylogenetische Studien basierend auf isolierter RNA aus *Eidolon*-Flughunden und der Nachweis von Henipavirus-Antikörpern in Schweinen weisen eindeutig auf das Vorkommen Henipavirus-ähnlicher Viren in Afrika hin. Leider ist es bislang nie gelungen vermehrungsfähige Viren aus Flughunden zu isolieren. Es ist daher nicht möglich durch Infektionsstudien abzuklären, inwieweit diese Viren fähig sind, sich in anderen Tierspezies und dem Menschen zu vermehren (pathogenetisches Potential). Ziel dieser Arbeit ist es deshalb die biologischen Aktivitäten wichtiger viraler Proteine zu charakterisieren, um eine Risikoabschätzung dieser neu entdeckten afrikanischen Henipaviren zu erleichtern. Für eine erfolgreiche Infektion menschlicher Zellen durch Henipaviren ist das Zusammenspiel der beiden Oberflächenproteine F und G von großer Bedeutung. Die ersten Schritte einer erfolgreichen Infektion, die den Eintritt der Viren in die Zelle vermitteln, bestehen aus der Bindung des Glykoprotein G an einen passenden Zellrezeptor (EphrinB2/B3) und der F-vermittelten Virus-Zell-Fusion. Beides, Rezeptorbindung und Fusion, kann durch die Koexpression der beiden Glykoproteine in geeigneten Zellkulturen überprüft werden. Sind sowohl G als auch F funktionell, kommt es dabei zur Zell-Zell-Fusion (Synzytienbildung). Um die Funktionalität der afrikanischen Henipavirus-Glykoproteine zu untersuchen, sollten

zunächst die beiden Glykoproteine F und G des Prototyp GH-M74a in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden. Nach der Expressionskontrolle durch indirekte Immunfluoreszenz soll die biologische Aktivität mit Hilfe von Fusionsassays getestet werden. Ergeben sich hierbei maßgebliche funktionelle Defekte in einem der beiden Glykoproteine, sollen diese tiefergehend analysiert werden. Dazu sollen dann zunächst, mit Hilfe von Western Blot Analysen und Biotinylierungen die Gesamt- und Oberflächenexpression der Glykoproteine mit denen der funktionellen NiV-F und -G-Proteine verglichen werden. Sollte sich für das GH-M74a-F ein funktioneller Defekt in der Vermittlung der Zell-Zell-Fusion ergeben, soll die F-Aktivierung durch Inhibitorstudien und die Analyse gezielt veränderter F-Proteine genauer untersucht werden.

Die funktionelle Charakterisierung der Glykoproteine neuer afrikanischer Henipaviren im Vergleich zu den F- und G-Proteinen humanpathogener Hendra- und Nipahviren soll letztendlich dazu beitragen, das pathogenetische Potential der afrikanischen Henipaviren abzuschätzen, die Speziesbarriere zu überwinden und Infektionen im Menschen zu verursachen.

II. Ergebnisse

2.1 Herstellung der M74-Plasmide

Die cDNA für das G- und F-Gen des afrikanischen Henipavirus GH-M74a wurde uns von J.F. Drexler und C. Drosten (Bonn) zur Verfügung gestellt. Dieser cDNA wurde mittels rekombinanter PCR-Mutagenese (5.1.8) und speziell konstruierten Primern jeweils vor dem Start- und nach dem Stopcodon neue Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme NotI und NheI angehängt. Außerdem wurde vor dem Stopcodon ein HA- oder ein Doppel-Flag-tag eingefügt, der die spätere Detektion über kommerzielle Antikörper erlauben sollte. Als Expressionsvektor wurde der Vektor pCAGGS verwendet, da dieser aufgrund seines Aktinpromotors eine hohe Fremdprotein-Expressionsrate in allen Säugerzellen garantiert. Durch Verdau der PCR-Produkte und des pCAGGS-Vektors (5.1.4) mit den gleichen Restriktionsenzymen (NotI und NheI) entstanden frei überhängende, kompatible Enden, die durch Ligation (5.1.7) zusammengefügt werden konnten. Die so erzeugten pCAGGS-GH-M74a-F und pCAGGS-GH-M74a-G-Plasmide wurden anschließend in *E.coli* transformiert (5.1.1), und auf LB-Platten mit Ampicillin selektioniert. Positive Klone wurden gepickt, angezüchtet und mittels Miniprep Kit (5.1.2) die Plasmid-DNA isoliert. Nach positiver Sequenzierung erfolgte eine erneute Amplifikation in einer Maxikultur und eine Plasmid-DNA Isolierung sowie eine erneute Kontrollsequenzierung. Die aus den Bakterien aufgereinigte Plasmid-DNA konnte für die Expressionsstudien der neuen afrikanischen Henipavirus-Glykoproteine in Zellkultur verwendet werden. Zur Übersichtlicheren Darstellung wird im Folgenden die Bezeichnung M74 statt GH-M74a verwendet.

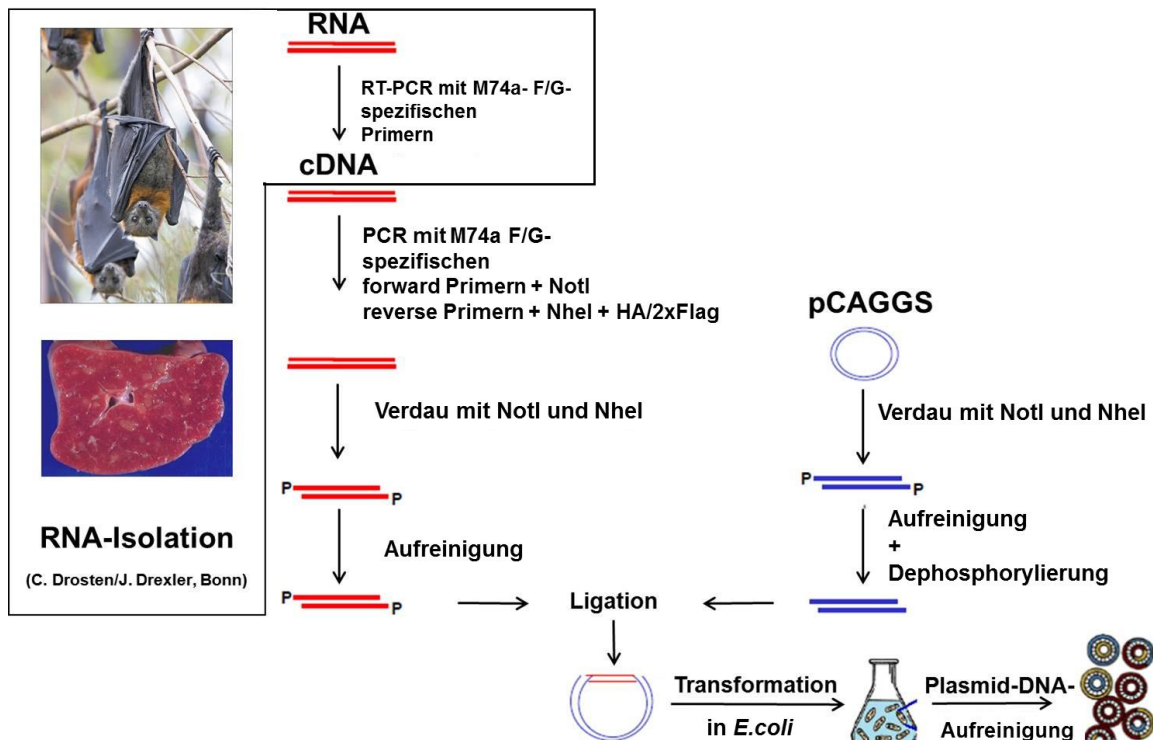


Abb. 2.1: Arbeitsschritte bei der Klonierung der afrikanischen Henipavirus-Glykoproteine von M74. RNA-Isolierung und Umschreiben in cDNA wurde in der AG Drexler von Tabea Binger durchgeführt.

Auf diese Weise wurden folgende Konstrukte hergestellt:

pCAGGS-M74-F

pCAGGS-M74-F_{HA}

pCAGGS-M74-F_{2xFlag}

pCAGGS-M74-G_{HA}

pCAGGS-M74-G_{2xFlag}

2.2 Biologische Aktivität der M74-Glykoproteine in verschiedenen Zelllinien

2.2.1 Expressionsnachweis der M74-Glykoproteine

Nach Klonierung und erfolgreicher Sequenzierung der Konstrukte musste kontrolliert werden, ob die Glykoproteine in dieser Form in eukaryotischen Zellen auch exprimiert werden und ob es möglich ist, diese über die C-terminalen HA- bzw. 2xFlag-tags zu detektieren. Hierzu wurden Vero- und MDCK-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert (5.2.4 und 5.2.5). 24 h nach der Transfektion wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt, wobei die Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert und dann mit anti-tag Primärantikörpern und AlexaFluor568 gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Präparate zusätzlich mit DAPI gefärbt.

Wie in Abb. 2.2 ersichtlich, konnten alle M74-F- und G-Konstrukte eindeutig in den Zellen nachgewiesen werden. Die Verteilung der beiden Proteine lässt sich mit der Verteilung der entsprechenden NiV-Glykoproteine vergleichen. Auch in der Transfektionseffizienz gab es keine größeren Unterschiede.

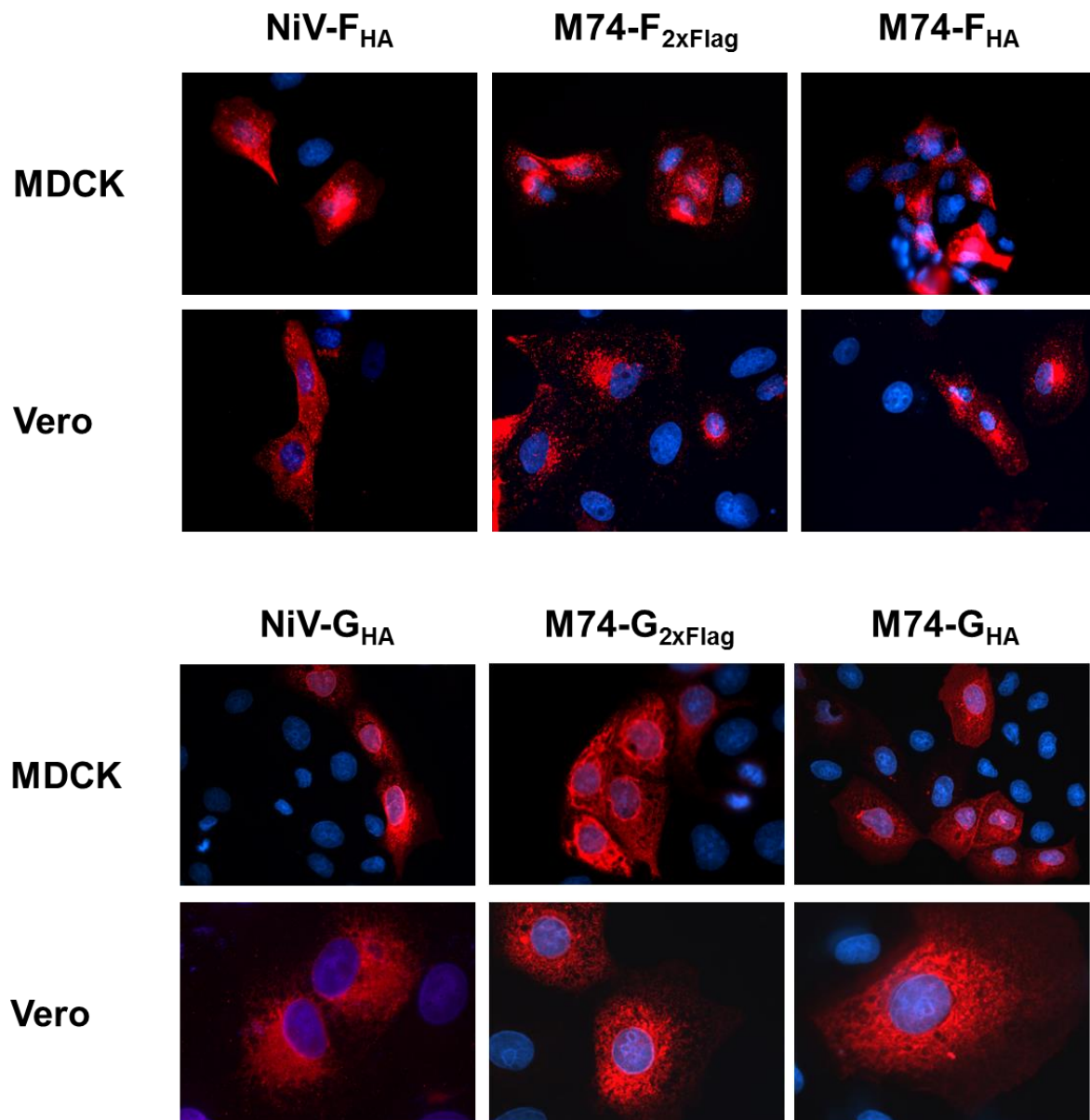


Abb. 2II.2: Immunfluoreszenz-Analyse der M74 Glykoproteine in MDCK- und Vero-Zellen. MDCK- und Vero-Zellen wurden mit den pCAGGS-M74 Konstrukten transfiziert. 24 h p.t. erfolgte die Fixierung mittels Met/Ac für 10 min und die darauf folgende Markierung der Proteine mit einem anti-tag Antikörper (1:100-1:200) und durch einen AlexaFluor568-gekoppelten Zweitantikörper (1:250). Auswertung mit einem Axiovert 200M-Mikroskop, 630fache Vergrößerung.

2.2.2 Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in HypNi/1.1- und Vero-Zellen

Nachdem die Immunfluoreszenzanalysen gezeigt hatten, dass beide Glykoproteine exprimiert werden, musste untersucht werden, ob die Proteine auch biologisch aktiv sind. Die durch Henipavirus-Glykoproteine vermittelte Zell-Zell-Fusion ist eine äußerst wichtige biologische Aktivität der Proteine, da sie die Ausbreitung der Virusinfektion direkt von Zelle zu Zelle ermöglicht, ohne dass eine Virusfreisetzung stattfinden muss. Da für diese Fusionsaktivität keine weiteren viralen Faktoren nötig sind, ist die Untersuchung der Fusionsaktivität nach Koexpression von Henipavirus G+F-Proteinen eine einfache Möglichkeit die biologische Aktivität der beiden Proteine zu testen. Exprimiert man die beiden Henipavirus-Glykoproteine in Ephrin-positiven Zellen, so kommt es zu einer Zell-Zell-Fusion und zur Ausbildung von Riesenzellen (Synzytien). Dabei hängt das Ausmaß der Zell-Zell-Fusion ausschließlich von der Effizienz der G-vermittelten Rezeptorbindung und der Fusionsaktivität des F-Proteins ab. Um zu klären, ob die beiden M74-Glykoproteine biologisch aktiv sind, wurden qualitative Fusionsassays durchgeführt (5.3.9). Hierzu wurden die beiden Glykoproteine in Ephrin-positive Zellen kotransfiziert und 24 h nach der Transfektion mittels Giemsa-Färbung die Synzytienbildung sichtbar gemacht (Abb. 2.3). Da beschrieben ist, dass durch das Anhängen eines HA-tags an den C-Terminus der intrazelluläre Transport verändert werden könnte (Popa et al., 2011), haben wir für Fusionsassays das M74-F_{2xFlag} und das M74-G_{HA} benutzt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Herrler (Hannover) konnten wir beschreiben, dass es in den für diesen Fusionsassay standardmäßig genutzten Vero-Zellen nicht zu einer Zell-Zell-Fusion bei Koexpression der beiden M74-Glykoproteinen kommt, jedoch in einer Fledermauszelllinie namens HypNi/1.1 (Krüger et. al, 2013). In Abb. 2.3 sieht man in der Giemsa-Färbung der transfizierten HypNi/1.1-Zellen mehrere mehrkernige Riesenzellen, deren Zellkerne sich zusammengelagert hatten. In der Giemsa-Färbung der transfizierten Vero-Zellen konnte selbst 72 h p.t. kein einziges Synzytium detektiert werden.

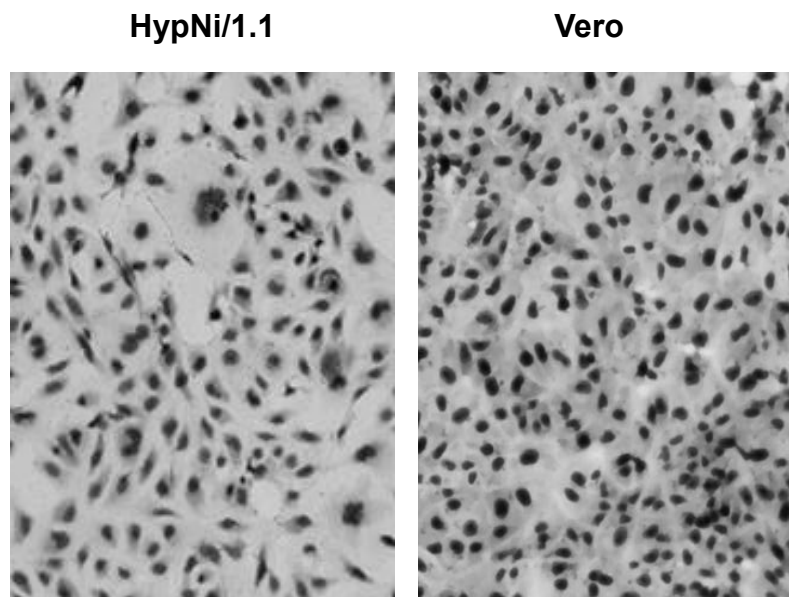


Abb. 2II.3: Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in HypNi/1.1- und Vero-Zellen. Beide Zelllinien wurden mittels LFA2000 (HypNi/1.1) oder FuGENE HD (Vero) mit den beiden M74-Glykoproteinen kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen durch 10 min Inkubation mit 70 % Ethanol fixiert und im Anschluss 30 min mit Giemsa-Lösung (1:10 in dH₂O) angefärbt. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 100fache Vergrößerung.

2.2.3 Untersuchungen zur Koexpression der M74-Glykoproteine

Da es nur zu einer Zell-Zell-Fusion kommen kann, wenn beide Glykoproteine in einer Zelle koexprimiert werden, sollte überprüft werden, ob in den Vero-Zellen vielleicht keine Koexpression der Glykoproteine möglich ist und dies der Grund für die fehlende Zell-Zell-Fusion ist. Um dies zu testen wurden die beiden M74-Glykoproteine in Vero-Zellen kotransfiziert. 24 h p.t. wurde dann zum Nachweis der Koexpression der beiden Glykoproteine, das Flag-markierte M74-F_{2xFlag} und das HA-tag-markierte M74-G_{HA} durch spezifische Antikörper in einer Immunfärbung nachgewiesen.

Wie in Abb. 2.4 zu erkennen, ist das Synzytium in den HypNi/1.1-Zellen positiv für das M74-F_{2xFlag} (rot) und das M74-G_{HA} (grün). Auch in den Vero-Zellen gibt es eindeutig mehrere Zellen, die sowohl das M74-F als auch das G-Protein exprimieren und in Kontakt zu umliegenden, Rezeptor-tragenden Zellen stehen. Somit muss man

schlussfolgern, dass es trotz Koexpression der beiden M74-Glykoproteinen in Vero-Zellen zu keiner detektierbarer Zell-Zell-Fusion kommt.

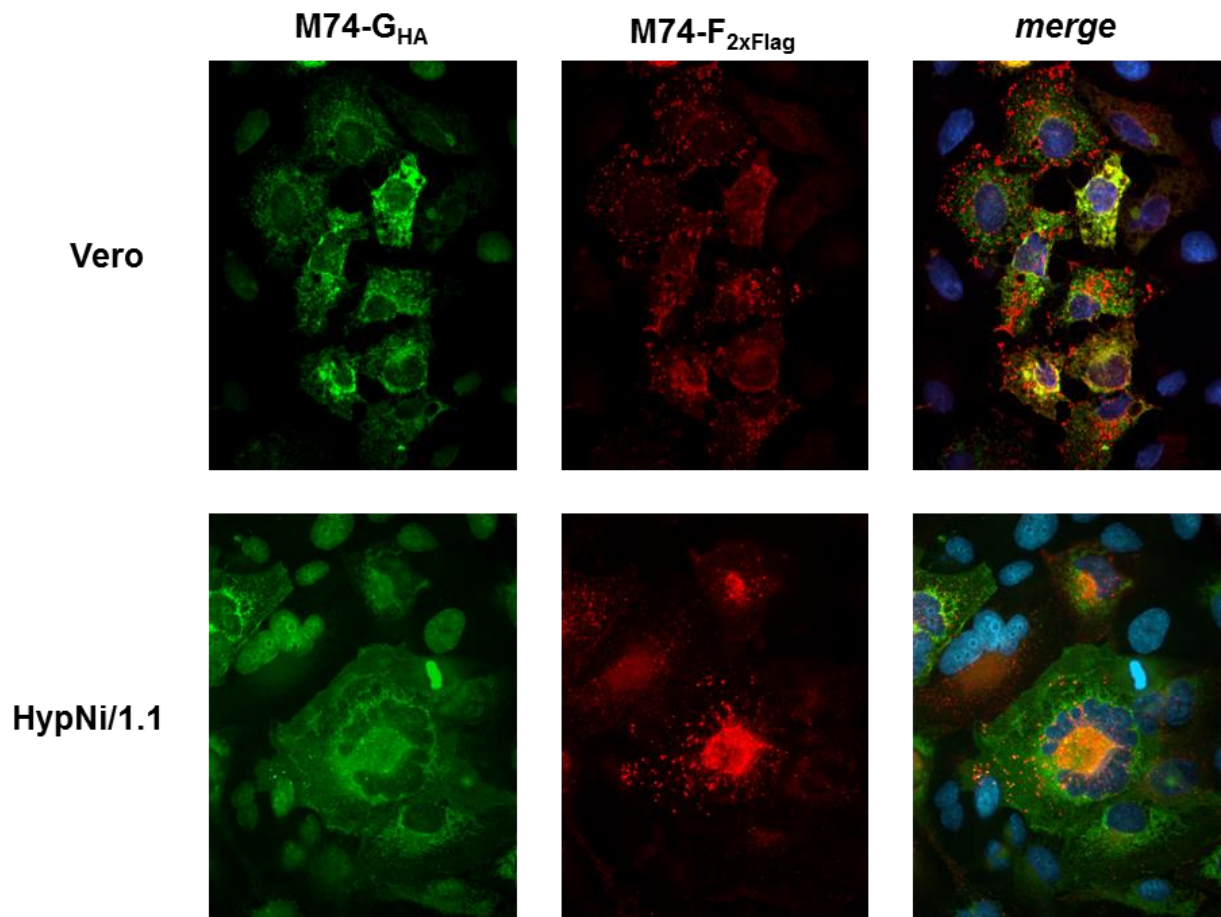


Abb. 2II.4: Koexpression der beiden M74-Glykoproteine in HypNi/1.1 und Vero-Zellen. Beide Zelllinien wurden mit den M74 Glykoproteinen kotransfiziert (HypNi/1.1 mit LFA2000, Vero mit FuGENE HD). 24 h p.t. wurden die Zellen mit Met/Ac 10min fixiert und permeabilisiert und danach mit einem anti-HA (aus Maus) und anti-Flag Antikörper (aus Kaninchen) markiert. Darauf folgte eine Inkubation mit einem AlexaFluor488-gekoppelten anti-Maus (grün) und einem AlexaFluor568-gekoppelten anti-Kaninchen (rot) Sekundärantikörper zur Detektion der Glykoproteine. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Auswertung mit einem Axiovert 200M-Mikroskop, 630fache Vergrößerung.

2.2.4 Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in weiteren/verschiedenen Henipavirus-permissiven Zelllinien

Um zu klären, ob die in Vero-Zellen beobachtete fehlende Fusionsaktivität auf diese Zellen beschränkt ist, wurden die beiden Glykoproteine in mehreren verschiedenen Zelllinien aus unterschiedlichen Säugerspezies koexprimiert, die bekanntermaßen durch Henipaviren infizierbar und damit permissiv sind. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Met/Ac fixiert und die Synzytienbildung mittels Giemsa-Färbung sichtbar gemacht.

Abbildung 2.5 zeigt deutlich, dass es mit den M74-Glykoproteinen in keiner der getesteten Zelllinien zur Synzytienbildung kommt (mittlere Spalte), wohingegen die Kotransfektion der NiV-Glykoproteine in allen Zelllinien zu deutlichen Synzytien führt (rechte Spalte). Besonders hervorzuheben ist die fehlende Fusion in EidNi/41.3-Zellen. Diese sind Nierenzellen aus Flughunden der Gattung *Eidolon*, aus denen die M74-RNA isoliert wurde. Dies könnte Hinweise darauf sein, dass sich die Viren nur in bestimmten Zelltypen in ihrem Flughundwirt ausbreiten können.

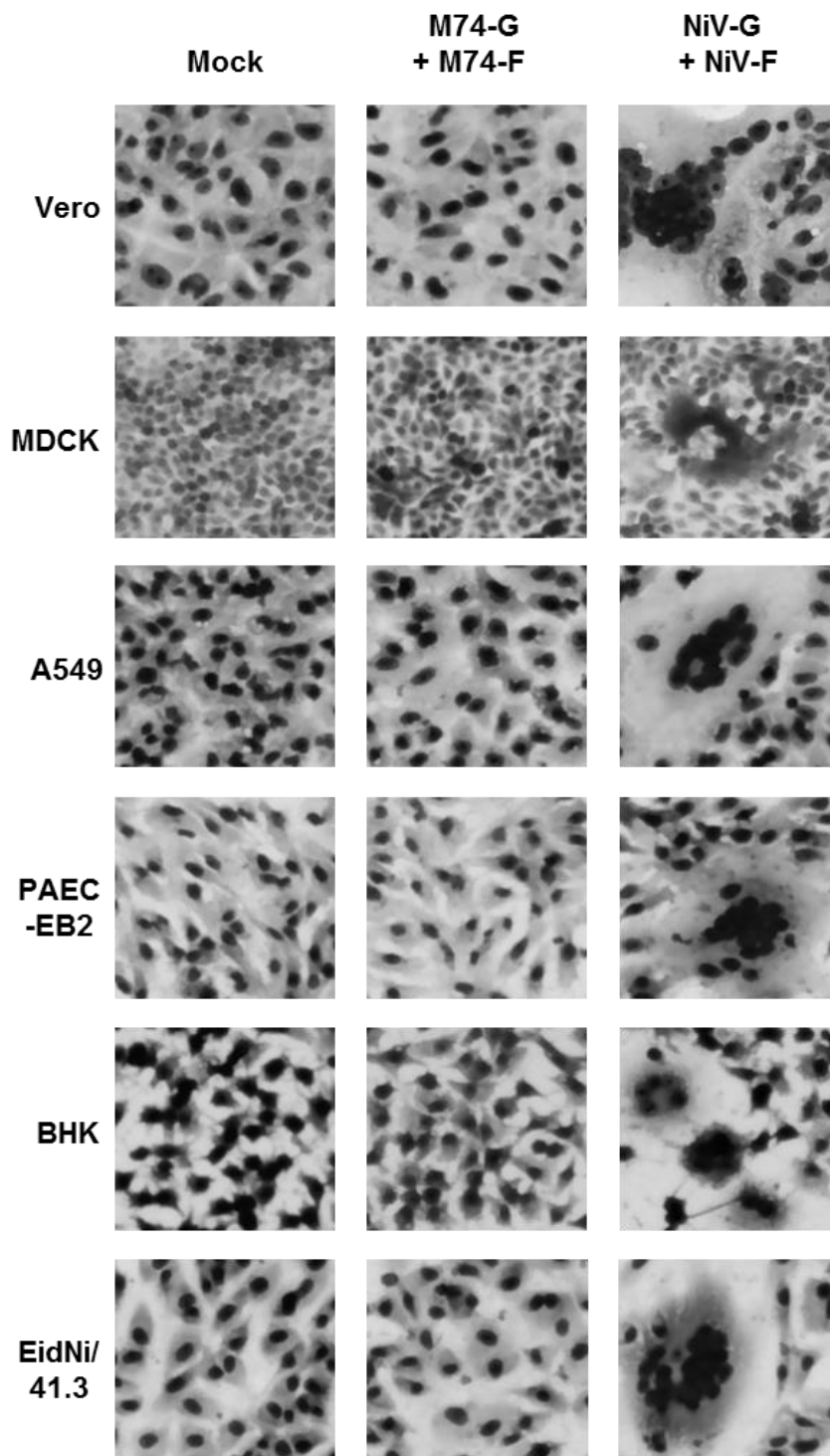


Abb. 2.5: Nachweis der Synzytienbildung in Henipavirus-permissiven Zelllinien. Vero (Affennierenzellen), MDCK (Hundenierenzellen), A549 (humane Lungenepithelzellen), PAEC-EB2 (Schweineaortaendothelzellen), BHK (Hamsternierenzellen) und EidNi/41.3 (*Eidolon helvum* Nierenzellen) wurden mit den G/F-Glykoproteinen von M74 und NiV kotransfiziert. 24-48 h nach der Kotransfektion wurde die Synzytienbildung durch eine Giemsa-Färbung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Epos, 400fache Vergrößerung.

2.2.5 Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine bei heterotypischer Koexpression mit den NiV-Glykoproteinen

Für eine Synzytienbildung sind zwei funktionelle Glykoproteine nötig. Somit ließ sich aus den vorherigen Ergebnissen nicht schließen, welches der M74-Proteine für die fehlende Zell-Zell-Fusion verantwortlich ist. Um dies zu klären, wurden heterotypische Fusionsassays durchgeführt (5.3.10). Dabei wurde jeweils ein funktionelles Glykoprotein des NiV mit einem Glykoprotein von M74 kotransfiziert. Wie zuvor beobachtet, kommt es in Vero-Zellen zur Zell-Zell-Fusion bei Koexpression der beiden NiV-Glykoproteine (Abb. 2.6a). Außerdem sieht man eine gewisse Synzytienbildung bei der Koexpression des M74-G mit dem NiV-F (Abb. 2.6c), nicht aber wenn das M74-F mit dem NiV-G zusammen exprimiert wird (Abb. 2.6b). Dieses Ergebnis legt nahe, dass das M74-G-Protein prinzipiell funktionell ist, d.h. eine Fusions-Helferfunktion (*fusion helper function*) ausüben kann, auch wenn diese geringer scheint als die des NiV-G. Dieser heterotypische Fusionsassay zeigt damit, dass der beobachtete Fusionsdefekt vor allem im M74-F-Protein liegt.

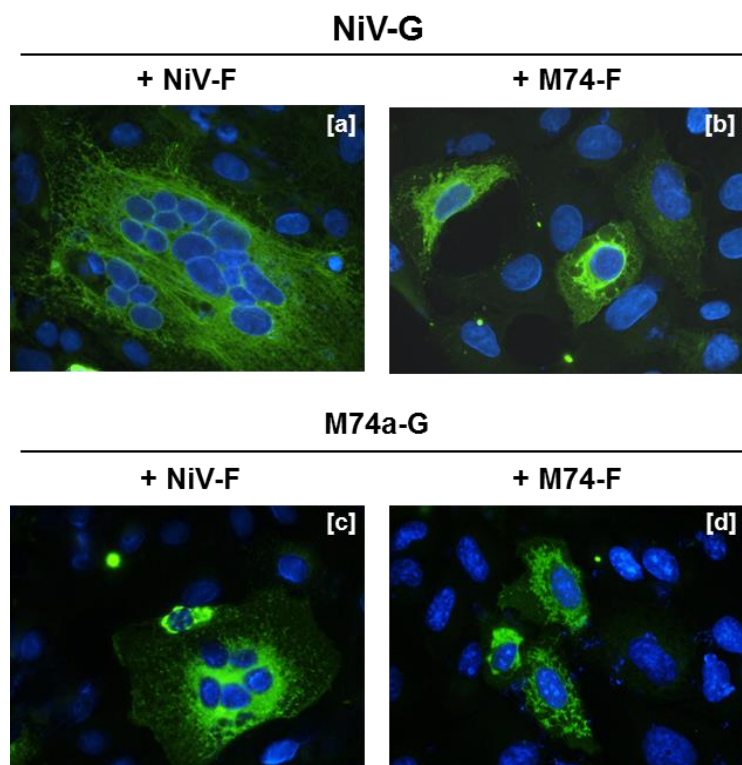


Abb. 2II.6: Heterotypischer Fusionsassay in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit NiV-G und NiV-F (a), NiV-G und M74-F (b), M74-G und NiV-F (c) oder M74-G und M74-F (d) kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit Met/Ac fixiert und permeabilisiert. Die Glykoproteine wurden mit anti-HA und anti-Flag und AlexaFluor488-gekoppelten Sekundärantikörpern markiert. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI sichtbar gemacht. Auswertung mit Axiovert 200M-Mikroskop, 630fache Vergrößerung.

2.3 Charakterisierung der Fusionsaktivität in HypNi/1.1-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es bei Koexpression beider M74-Glykoproteine nur in HypNi/1.1-Zellen zu einer Zell-Zell-Fusion kommt, stellte sich die Frage, was die Besonderheit dieser HypNi/1.1-Zellen ist. Gründe für die Fusion könnten zum einen auf speziellen Eigenschaften der HypNi/1.1-Zellen selbst basieren, wie etwa eine generell erhöhte EphrinB2/B3-Expression, oder die Expression eines zusätzlichen, bislang unbekannten Rezeptors oder eine grundsätzlich erhöhte Fusogenität im Vergleich zu den anderen Zelllinien. Es könnte jedoch auch sein, dass es nicht an speziellen Eigenschaften der HypNi/1.1-Zellen liegt, sondern daran, dass sich die Expression der Glykoproteine in diesen Zellen unterscheidet. Um letzteres zu untersuchen, wurde die Gesamtexpression, die Oberflächenexpression und die M74-F-Spaltung und Aktivierung im Vergleich zu anderen Zelllinien analysiert.

2.3.1 Vergleich der M74-Glykoproteinexpression in verschiedenen Zelllinien

Um die Expression der M74-Glykoproteine in HypNi/1.1-Zellen mit der Expression in Zelllinien zu vergleichen, in denen sie keine Zell-Zell-Fusion induzieren können, wurden MDCK-, Vero- und HypNi/1.1-Zellen mit dem M74-F-Protein allein oder zusammen mit dem M74-G-Protein exprimiert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit RIPA-Puffer lysiert, Zellreste abzentrifugiert und über Nacht eine Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern (aus Kaninchen) durchgeführt. Nach der Immunpräzipitation erfolgte eine Fällung mit ProteinA-Sepharose und nach mehrmaligem Waschen ein Aufkochen in 2x SDS-Probenpuffer mit 4 % Mercaptoethanol. Die Proben wurden dann in einem 15 % SDS Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran geblottet. Diese wurde über Nacht mit 5 % Milchpulver abgesättigt und darauffolgend mit anti-tag (Maus) Antikörpern und biotinylierten Sekundärantikörpern, Strep/Pox angefärbt und durch Chemilumineszenz (ECL) mit Hilfe des Chemidocs entwickelt.

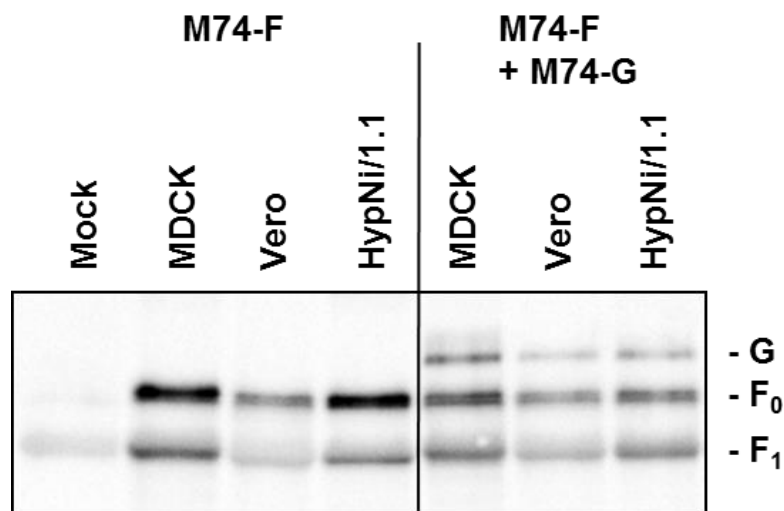


Abb. 2.7: Western Blot Analyse des M74-F Proteins in verschiedenen Zelllinien. MDCK-, Vero- und HypNi/1.1-Zellen wurden mit 1 µg pCAGGS-M74-F_{2xFlag} bzw. 0,5 µg pCAGGS-M74-F_{2xFlag} und 0,5 µg pCAGGS-M74-G_{HA} transfiziert. 24 h p.t. erfolgte eine RIPA-Zelllyse und eine anschließende Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern (aus Kaninchen) (1:100-1:500). Danach wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit Hilfe anti-tag spezifischer Primärantikörper (aus Maus), biotinylierter Sekundärantikörper, einem Streptavidin/HRP-Komplex und Chemilumineszenz. Die Auswertung erfolgte am Chemidoc (Biorad).

In Abbildung 2.7 ist zu erkennen, dass sich die Gesamtexpression der Glykoproteine in HypNi/1.1-Zellen im Vergleich zu MDCK-Zellen nicht signifikant unterscheidet. Vero-Zellen scheinen hingegen etwas geringere Mengen der Glykoproteine zu exprimieren. Die geringere Glykoproteinexpression in Vero-Zellen könnte daraus entstanden sein, dass die Vero-Zellen mit FuGENE HD transfiziert wurden, welches wahrscheinlich nicht an die Transfektionseffektivität von LFA2000 heranreicht, mit dem die MDCK- und HypNi/1.1-Zellen transfiziert wurden. Bei der Kotretransfektion beider Glykoproteine zeigt sich wie in der Einzelexpression keine erhöhte Expression in den HypNi/1.1-Zellen, die eine Zell-Zell-Fusion erklären könnte. Deutlich zu sehen ist in allen Zelllinien allerdings die Reduktion der F-Protein Menge, wenn das G-Protein zusätzlich transfiziert wurde. Dies ist dadurch zu erklären, dass auch nur die Hälfte der Plasmid-DNA zur Transfektion eingesetzt wurde.

2.3.2 Untersuchungen zur Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in einem Overlay-Fusionsassay

Nachdem die Expressionsvergleiche keine generell erhöhte F- oder G-Expression in HypNi/1.1-Zellen gezeigt hatte, sollte mit Hilfe von Overlay-Fusionsassays geklärt werden, ob die Fusion in HypNi/1.1-Zellen durch eine verbesserte M74-F- oder G-Oberflächenexpression in diesen Zellen erklärt werden kann. Für den Overlay-Fusionsassay wurden entweder Vero- oder HypNi/1.1-Zellen mit den M74-Glykoproteinen kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen mit Accutase abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. 2×10^4 der transfizierten Vero- bzw. HypNi/1.1-Zellen wurden auf dicht gewachsene unbehandelte HypNi/1.1- bzw. Vero-Zellen gegeben (Overlay). Die Zellgemische wurden dann 12 h bei 37°C inkubiert und danach auf eine Synzytienbildung überprüft. Nach der Durchlichtanalyse erfolgte eine spezifische Immunfluoreszenzfärbung (5.3.1), um die Expression der Glykoproteine nachzuweisen und eventuell auftretende kleinere Synzytien sichtbar zu machen. Mit diesem Overlay-Fusionsassay sollte getestet werden, ob in HypNi/1.1-Zellen exprimierte M74-Glykoproteine unbehandelte Vero-Zellen fusionieren können oder umgekehrt.

Wie in Abb. 2.8A zu erkennen, kommt es zu keiner Zell-Zell-Fusion in Vero-Zellen, wenn diese mit M74-F/G-exprimierenden HypNi/1.1-Zellen überschichtet werden. Das heißt, selbst wenn die M74-Glykoproteine in HypNi/1.1-Zellen hergestellt werden, in denen sie fusogen sind, können sie keine Zell-Zell-Fusion in Vero-Zellen induzieren. Im Gegensatz dazu kommt es jedoch zu einer deutlichen Synzytienbildung in unbehandelten HypNi/1.1-Zellen, die mit M74-Glykoprotein-exprimierenden Vero-Zellen überschichtet werden. Um die Spezifität dieser Synzytien zu bestätigen, wurden die Zellen nach der Durchlichtmikroskopie fixiert und die Glykoproteine mit tag-spezifischen Antikörpern markiert. Abb. 2.8B zeigt die Koexpression beider M74-Glykoproteine in den Synzytien. Somit sind die in Vero-Zellen exprimierten M74-Glykoproteine offensichtlich in der Lage Zell-Zell-Fusion in HypNi/1.1-Zellen zu induzieren. Das bedeutet, dass die Synzytienbildung in HypNi/1.1-Zellen nicht auf eine verbesserte Oberflächenexpression der Glykoproteine in diesen Zellen zurückzuführen ist, sondern dass diese Zellen

wahrscheinlich andere fusogene Eigenschaften besitzen und deshalb leichter fusionieren als anderen Zelllinien.

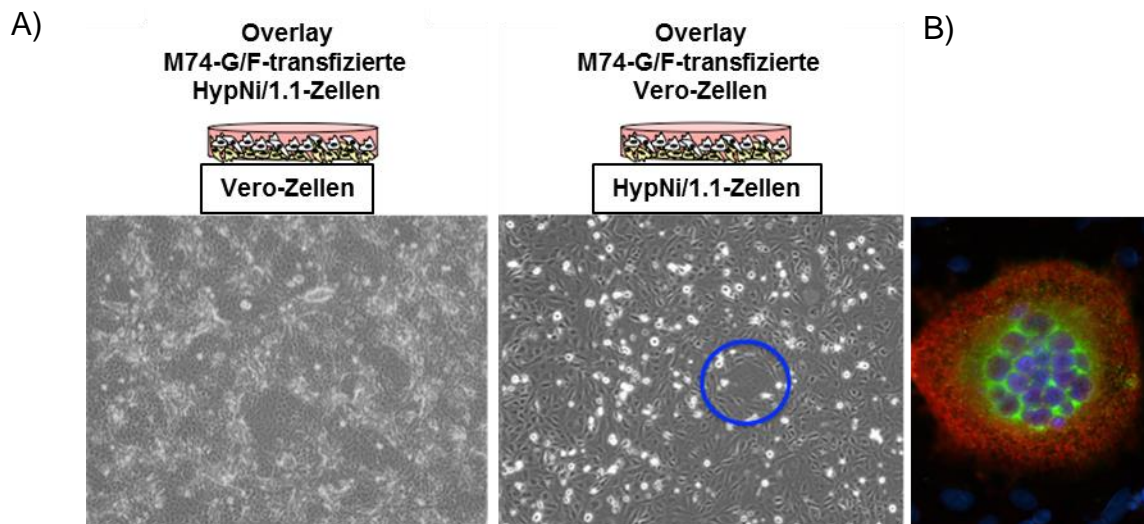


Abb. 2.8: Overlay-Fusionsassay. A) HypNi/1.1- und Vero-Zellen wurden mit M74-F_{2xFlag} und M74-G_{HA} kotransfiziert und 24 h p.t. mit Accutase abgelöst. 2×10^4 transfizierte HypNi/1.1-Zellen wurden auf untransfizierte Vero-Zellen gegeben (rechts) bzw. 2×10^4 transfizierte Vero-Zellen auf untransfizierte HypNi/1.1-Zellen (Mitte). Die Zellen wurden dann für 12 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 100fache Vergrößerung. B) Die Zellen wurden mit Met/Ac 10 min fixiert und die Glykoproteine mit anti-HA (Maus) und anti-Flag (Kaninchen) für 1h markiert und anschließend mit anti-Maus-AlexaFluor488 und anti-Kaninchen-AlexaFluor568 gekoppelten Sekundärantikörpern für 45 min sichtbar gemacht. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Axiovert 200M-Mikroskop, 630fache Vergrößerung. Gezeigt ist ein ausgewähltes Synzytium von HypNi/1.1-Zellen, die mit G/F-transfizierten Vero-Zellen überschichtet wurden.

2.4 Charakterisierung des intrazellulären Transport und der Aktivierung des M74-F-Proteins

2.4.1 Vergleich der M74-F und NiV-F Oberflächenexpression

Der heterotypische Fusionsassay (Abb. 2.6) zeigte, dass der Hauptgrund für die defiziente Zell-Zell-Fusion vor allem im M74-F-Protein liegt. Da ein effizienter Transport der gespaltenen Form zur Zelloberfläche eine wichtige Voraussetzung ist, damit das M74a-F-Protein überhaupt fusionieren kann, sollte geklärt werden, ob es

hier einen Defekt gibt. Dazu wurde zunächst die Menge des an der Zelloberfläche exprimierten M74-F-Proteins mit der des NiV-F-Proteins mit Hilfe einer Oberflächenbiotinylierung (5.3.2) verglichen. Hierzu wurden MDCK- und Vero-Zellen in 6-well-Platten mit dem jeweiligen Fusionsprotein transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Oberflächenproteine zweimal mit S-NHS-Biotin markiert. Nach einer Zelllyse und der Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern wurde das Präzipitat mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt, der 4 % β -Mercaptoethanol enthielt. Dadurch wurden die Disulfidbrücken zwischen den beiden F-Untereinheiten reduziert, was zur Folge hat, dass gespaltenes F-Protein in Form getrennter F₁- und F₂-Untereinheiten im SDS-Gel zu detektieren ist. Nach der Auftrennung der Proteine in einem 12 % Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (*Semy-Dry-Blot*; 5.3.5). Nachgewiesen wurden die biotinylierten Proteine durch Inkubation mit einem Strep/Pox-Komplex und ECL. Dieses wird durch die HRP umgesetzt und in einer Oxidasereaktion Licht emittiert. Diese Lichtemission wurde an einem Chemidoc aufgenommen.

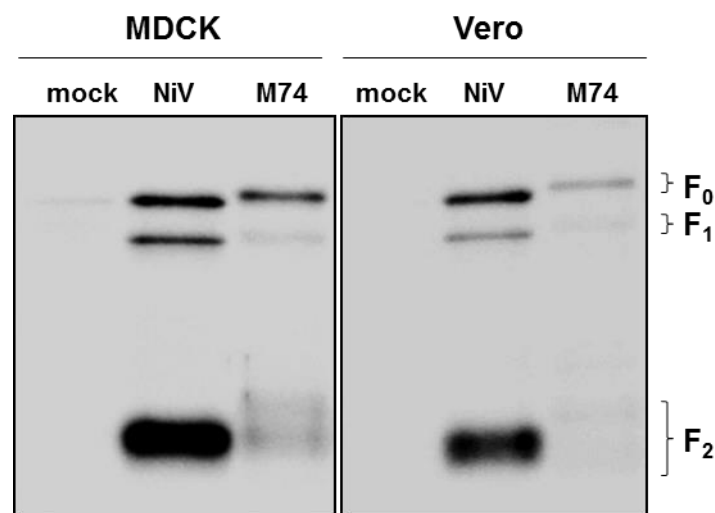


Abb. 2.9: Nachweis und Vergleich der M74-F und NiV-F Oberflächenexpression. MDCK- und Vero-Zellen wurden mit pCAGGS-NiV-F_{HA} bzw. pCAGGS-M74-F_{2xFlag} transfiziert. 24 h p.t. erfolgte die Oberflächenbiotinylierung mit darauf folgender Zelllyse mit RIPA-Puffer. Anschließend an die Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern (1:100-1:500) wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem Strep/Pox-Komplex und Chemilumineszenz.

In der Oberflächenbiotinylierung (Abb. 2.9) ist sowohl in MDCK- als auch in Vero-Zellen ein Signal für das M74-F-Protein zu sehen. Neben einer Bande für das ungespaltene Protein F_0 sieht man auch Banden für die beiden Untereinheiten F_1 und F_2 . Auffallend ist jedoch in beiden Zelllinien der enorme Mengenunterschied im Vergleich zum NiV-F-Protein. In beiden Fällen ist deutlich mehr NiV-F-Protein auf der Zelloberfläche. Dieser Unterschied ist noch größer, wenn man nur das aktive, gespaltene Protein, also die F_1 und F_2 Banden betrachtet.

2.4.2 Untersuchung der Spaltkinetik und Stabilität des M74-F

Da die Oberflächenbiotinylierungen deutlich geringere Mengen an gespaltenem M74-F an der Zelloberfläche zeigten (Abb. 2.9), wurden *Pulse Chase* Analysen durchgeführt. Durch diese kurzzeitige radioaktive Markierung sollte herausgefunden werden, ob die geringere Oberflächenexpression durch einen schnelleren Proteinabbau des M74-F-Proteins bedingt ist. Hierfür wurden aufsteigende *Chase* Zeiten verwendet, um das Protein in einem zeitlichen Verlauf zu beobachten und so sichtbar zu machen, wie schnell es abgebaut wird und wie effektiv die Spaltung des M74-F-Proteins erfolgt. F-exprimierende Zellen wurden 24 h p.t. mit (^{35}S)-Promix für 45 min markiert (*Pulse*). Darauf folgte ein *Chase* mit nicht-radioaktivem Medium über verschiedene Zeitintervalle (0 – 4 h), in dem die markierten Proteine weiter prozessiert werden. Nach dem *Chase* wurden die Zellen gewaschen und mit RIPA-Puffer lysiert. Die F-Proteine wurden mit anti-tag Antikörpern aus Kaninchen präzipitiert (5.3.3) und unter reduzierenden Bedingungen in einem 12 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Fixierung und Trocknen des Gels wurden die radioaktiv markierten Proteine durch digitale Autoradiographie nachgewiesen.

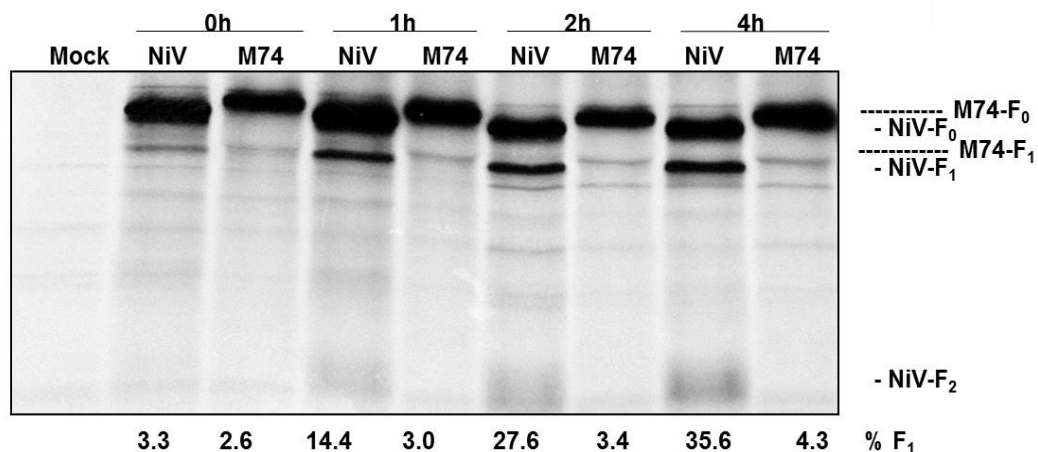


Abb. 2.10: Proteinstabilität und Spaltungskinetik von M74-F. In 6-well Platten gewachsene MDCK-Zellen wurden mit pCAGGS-NiV-F bzw. pCAGGS-M74-F mittels LFA2000 transfiziert. 24 h p.t. erfolgte eine 45-minütige radioaktive Markierung (*Pulse*) mit ^{35}S -Met/Cys (100 μCi) und eine darauf folgende Inkubation in nicht-radioaktivem Medium (*Chase*) über unterschiedliche Zeiträume (0, 1, 2 und 4 h). Nach der Zellyse erfolgte die Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern aus Kaninchen (1:100-1:500) und die Auftrennung der Proteine per SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Der Nachweis erfolgte durch digitale Autoradiographie.

Wie in Abb. 2.10 zu erkennen scheint die Gesamtproteinmenge des M74-F-Proteins, die in der 45-minütigen *Pulse*-Phase markiert wurde, nur leicht unter der des NiV-F-Proteins zu liegen (0 h). Zu allen Zeitpunkten ist eine deutliche F₀-Bande zu erkennen. Schon nach der Markierung (0 h *Chase*) sieht man zusätzlich zur F₀ Bande eine leichte F₁-Bande. Dies liegt an dem sehr schnellen Proteintransport in MDCK-Zellen, in denen scheinbar während des 45-minütigen *Pulse* schon F-Proteine zu ihrem Ort der Spaltung (Endosomen) transportiert wurden. Diese F₁-Banden nehmen für beide F-Proteine über den zeitlichen Verlauf zu. Es ist auffallend, dass die Menge des F₁-Spaltproduktes des M74-F-Proteins immer deutlich geringer als die des NiV-F ist. Eine F₂-Bande ist nur für das NiV-F-Protein zu detektieren, die Spalteffizienz des M74-F-Proteins ist dafür zu gering. Die Quantifizierung des Spaltproduktes F₁ bestätigt die sehr viel langsamere und geringere Spalteffizienz des M74-F-Proteins (max. 4,3 % nach 4 h). Die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge indes zeigt keine geringere Stabilität oder schnelleren Abbau des M74-F-Proteins im Vergleich zum NiV-F-Protein über einen *Chase*-Zeitraum von bis zu 12 h (nicht gezeigt). Somit lässt

sich sagen, dass das exprimierte M74-F-Protein zwar ähnlich stabil ist wie das NiV-F-Protein, jedoch seine Spaltung deutlich verlangsamer und ineffizienter erfolgt.

2.5 Charakterisierung chimärer M74-F-Proteine

2.5.1 Klonierung der chimären F-Proteine

Um herauszufinden welche Proteinbereiche für die verringerte M74-F-Spaltung und den ineffizienten Oberflächentransport verantwortlich sind, sollten chimäre NiV-M74-F-Proteine hergestellt werden. Da das F-Protein aus zwei Untereinheiten besteht (F_1 , F_2), lag es nahe, genau diese beiden Untereinheiten auszutauschen. Deshalb wurden mittels *Overlapping*-PCR (5.1.8) folgende zwei Chimären erstellt:

pCAGGS-M74- F_2 /NiV- F_1 HA

pCAGGS-NiV- F_2 /M74- F_1 2xFlag

2.5.2 Expressionsnachweis der chimären F-Proteine

Nachdem die F_2/F_1 -Chimären kloniert waren und ihre Sequenz durch Sequenzierungen bestätigt wurde, wurde die Proteinexpression der Chimären überprüft. Hierzu wurden MDCK-Zellen mit den Plasmiden für beide Chimären und als Kontrolle NiV-F und M74-F transfiziert. 24 h p.t. wurde eine Zelllyse mit anschließender Immunpräzipitation (5.3.3), SDS-Gelelektrophorese (5.3.4) und Western Blot Analyse (5.3.5 und 5.3.6) durchgeführt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels anti-tag Antikörpern und biotinylierten Sekundärantikörpern, sowie Strep/Pox und ECL.

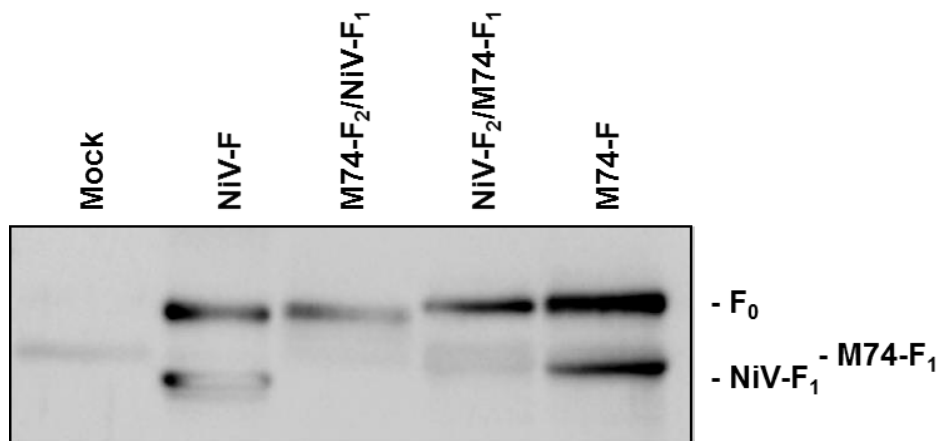


Abb. 2.11: Expression der NiV-M74-F-Chimären in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden mit den aufgeführten F-Konstrukten transfiziert. 24 h p.t. erfolgte die Zellyse mit RIPA-Puffer und anschließender Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern aus Kaninchen (1:100-1:500). Danach wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem Streptavidin/HRP-Komplex und Chemilumineszenz am Chemidoc.

Wie in Abb. 2.11 zu erkennen, werden beide Chimären exprimiert. Die Gesamtproteinmenge liegt aber nicht nur unterhalb der des NiV-F-Proteins sondern ist auch geringer als die des M74-F-Proteins. Auffallend ist auch, dass die beiden Chimären kein deutliches Spaltprodukt zeigen. Dies obwohl in beiden Chimären das einzelne Arginin an der Spaltstelle nicht verändert wurde und zumindest im Falle der M74-F₂/NiV-F₁ Chimäre die Transportsignale des NiV-F-Proteins für Endozytose und Recycling vollständig vorhanden.

2.5.3 Oberflächenexpression der F-Chimären

Nach der Kontrolle der Proteinexpression im Western Blot (Abb. 2.11) sollte geklärt werden, ob und in welchem Umfang die Chimären an die Zelloberfläche gelangen. Hierzu wurde eine Oberflächenbiotinylierung (5.3.2) von transfizierten MDCK-Zellen durchgeführt.

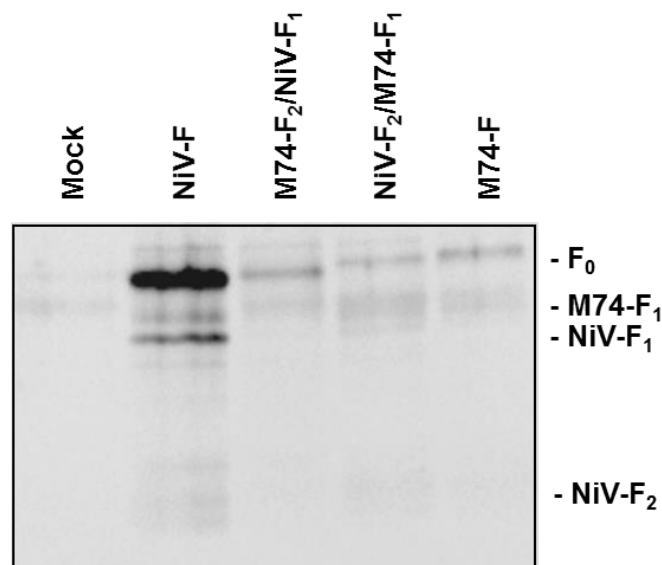


Abb. 2.12: Oberflächenexpression der F-Chimären in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden mit den angegebenen F-Plasmiden transfiziert. 24 h p.t. erfolgte eine Oberflächenbiotinylierung mit darauf folgender Zellyse. Anschließend an die Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern (aus Kaninchen) (1:100-1:500) wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit einem Streptavidin/HRP-Komplex und Chemilumineszenz am Chemidoc.

Die Oberflächenbiotinylierung der F-Chimären in Abb. 2.12 zeigt eine sehr geringe Proteinmenge für beide Chimären. Diese scheinen fast noch geringer auf der Zelloberfläche exprimiert zu werden als das M74-F-Protein. Wie in der vorangegangenen Western Blot Analyse (Abb. 2.11) ist auch auf der Oberfläche kein Spaltprodukt zu erkennen und somit keine fusionsaktive Form des Proteins vorhanden. Die Chimären werden also insgesamt schlechter exprimiert, gespalten und an die Oberfläche transportiert als unverändertes M74-F.

2.5.4 Untersuchung der Spaltkinetik und Proteinstabilität der F₂/F₁-Chimären durch *Pulse Chase* Analysen

Um die ineffiziente Expression der Chimären genauer zu studieren und Aufschlüsse über die Proteinstabilität zu erhalten, wurden *Pulse Chase* Analysen durchgeführt.

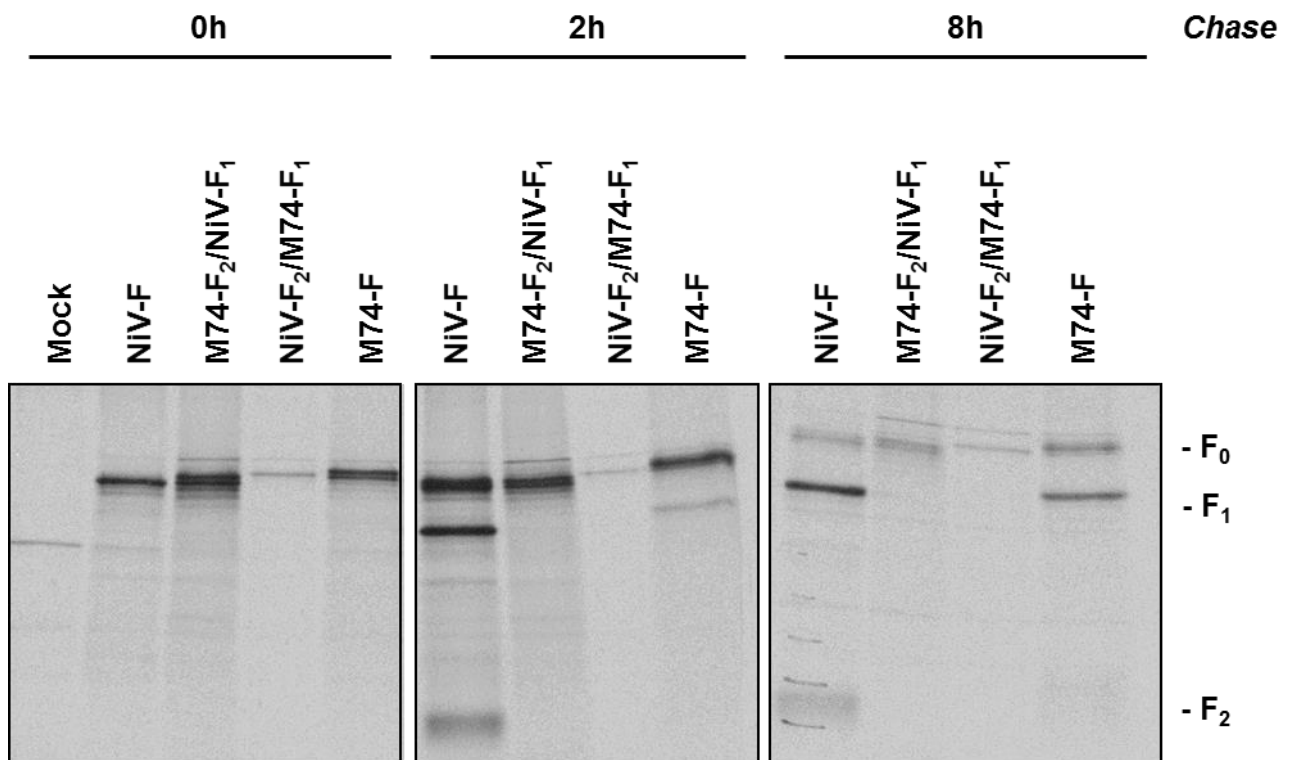


Abb. 2.13: Spaltungskinetik und Proteinstabilität der F-Chimären. MDCK-Zellen wurden mit den angegebenen F-Konstrukten in 6well Platten transfiziert. 24 h p.t. erfolgte die 45-minütige radioaktive Markierung (*Pulse*) mit ^{35}S -Met/Cys (100 μCi) und eine darauf folgende Inkubation über unterschiedliche Zeiträume (0, 2 und 8 h) in nicht radioaktivem Medium (*Chase*). Nach der RIPA-Zelllyse erfolgte die Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern aus Kaninchen (1:100-1:500) und die Auftrennung der Proteine per Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen. Der Nachweis erfolgte durch digitale Autoradiographie.

Wie in Abb. 2.13 zu erkennen, zeigen nach dem *Pulse* (0 h) alle Proteine lediglich die ungespaltene Form F₀. Die Proteinmengen für NiV-F und M74-F erscheinen wieder vergleichbar. Die M74-F₂/NiV-F₁ Chimäre scheint ebenso recht gut exprimiert. Nur die NiV-F₂/M74-F₁ Chimäre zeigt eine deutliche Reduktion der Proteinmenge. Nach 2 h *Chase* zeigt sich für das NiV-F wieder eine deutliche Spaltung mit klaren Banden für F₁ und F₂. Für das M74-F-Protein ist die Spaltung wie zuvor gezeigt reduziert, doch auch hier ist bereits eine F₁-Bande zu erkennen. Bei den zwei Chimären hingegen ist kein Spaltprodukt nachzuweisen. Selbst nach 8 h *Chase* ist keine F₁- oder F₂-Bande zu detektieren. Die Gesamtproteinmenge hat über die 8 h bei NiV-F, M74-F und M74-F₂/NiV-F₁ hindurch gleichmäßig abgenommen. Die Proteinmenge der NiV-F₂/M74a-F₁ Chimäre ist von Beginn deutlich reduziert, scheint aber über die Zeit stabil zu bleiben, wobei hier die Quantifizierung anhand der geringen Expression

wenig aussagekräftig ist. Insgesamt ergeben sich aus den *Pulse Chase* Analysen keine Anzeichen für eine schnellere Degradation der Chimären.

2.5.5 Fusionsaktivität der F-Chimären

Da selbst geringste Mengen des aktiven Fusionsproteins an der Zelloberfläche ausreichend sein können um Zell-Zell-Fusion zu induzieren, wurden trotz der geringen Oberflächenexpression Fusionsassays mit den Chimären durchgeführt. Hierzu wurden Vero-Zellen auf 24-well Platten ausgesät und mit den Chimären und M74-G kotransfiziert. 24 - 48 h p.t. wurden die Zellen nach Fixierung mit Giemsa-Lösung gefärbt und auf Synzytienbildung hin untersucht.

Die Fusionsassays in Abb. 2.14 (untere Reihe) zeigen für beide Chimären keine Synzytienbildung in Kombination mit dem M74-G Protein in Vero-Zellen. Auch in heterotypischer Kombination mit dem NiV-G konnte keine Zell-Zell-Fusion beobachtet werden (nicht gezeigt). Somit konnte mit keiner der F-Chimären die Expressionsrate, die Spalteffizienz oder die Fusionsaktivität des M74-F-Proteins erhöht werden.

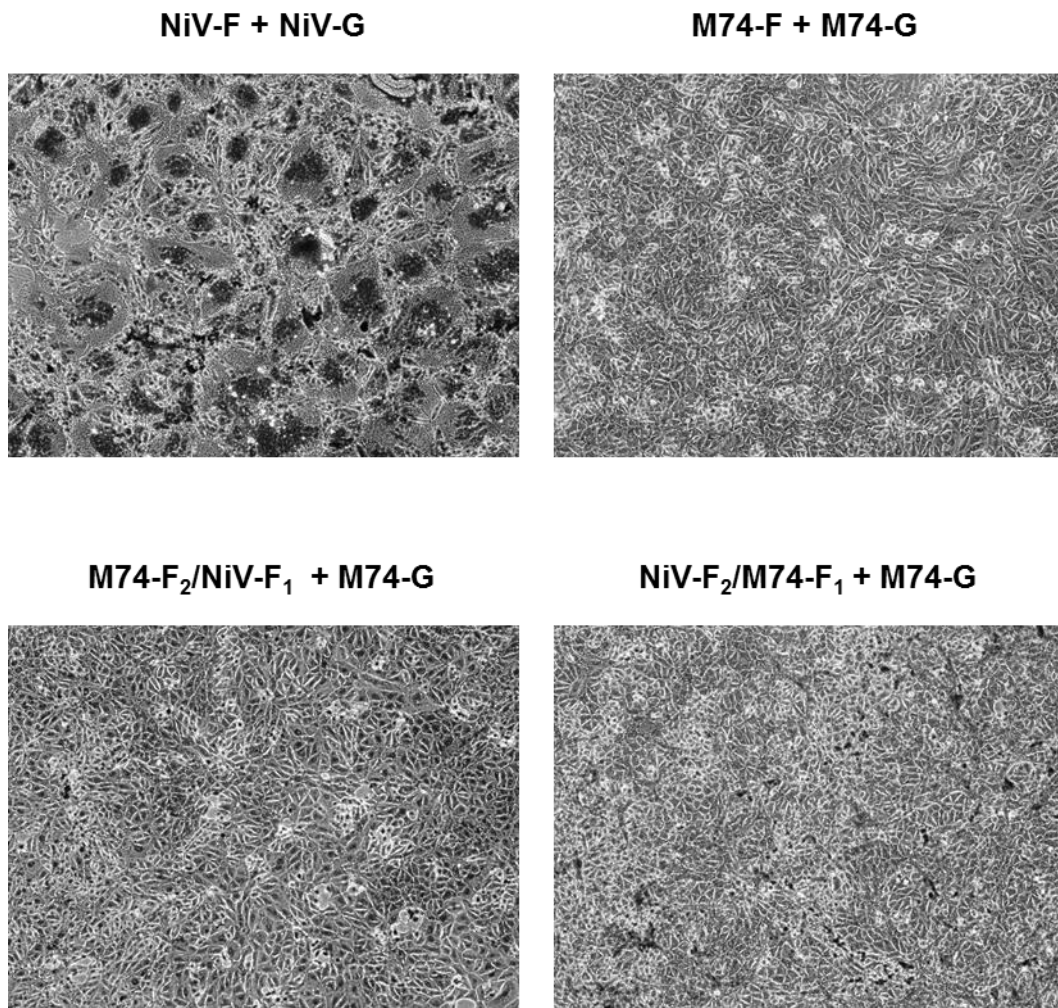


Abb. 2.14: Fusionsaktivität der F-Chimären in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mittels FuGENE HD jeweils mit einer F-Chimäre und dem M74-G-Protein kotransfiziert. Als Positivkontrolle diente die Kotransfektion von NiV-F mit NiV-G, als Negativkontrolle die Kotransfektion von M74-F und M74-G. 24 h p.t. wurden die Zellen durch 10 min Inkubation mit 70 % Ethanol fixiert und im Anschluss 30 min mit Giemsa-Lösung (1:10 in dH₂O) angefärbt. Die Auswertung erfolgte am AMG Amex1100 Mikroskop von Evos, 100fache Vergrößerung.

2.6 Einfluss von Startcodon-Mutationen auf die M74-F Expression

Nach der funktionellen Charakterisierung des M74-F-Proteins und der ersten Untersuchungen chimärer Proteine sollte die Rolle der für Henipaviren ungewöhnlich langen pre-SP Sequenz analysiert werden. Diese lange Sequenz hat möglicherweise regulatorische Funktionen und könnte somit der Grund für die schlechte Expression des M74-F-Proteins sein.

2.6.1 Untersuchung verschiedener Startcodon-Mutanten

Um die Funktion der mit 97-Aminosäuren ungewöhnlich langen pre-SP Sequenz zu bestimmen, sollte zuerst untersucht werden, ob auch wirklich das ATG an Position 1 als Genstart für die mRNA-Synthese genutzt wird. In der Sequenz des M74-F-Proteins befinden sich 13 *in frame* Startcodons, wobei das zweite *in frame* Startcodon an Position 119 in der vorhergesagten Signalpeptidsequenz liegt. Zur Analyse wurden Mutanten hergestellt, bei denen zum einen das ATG an Position 1 und zum anderen das zweite *in frame* ATG an Position 119 zu ACG mutiert wurde. Diese Mutanten wurden in Western Blot Analysen auf ihre Expression getestet.

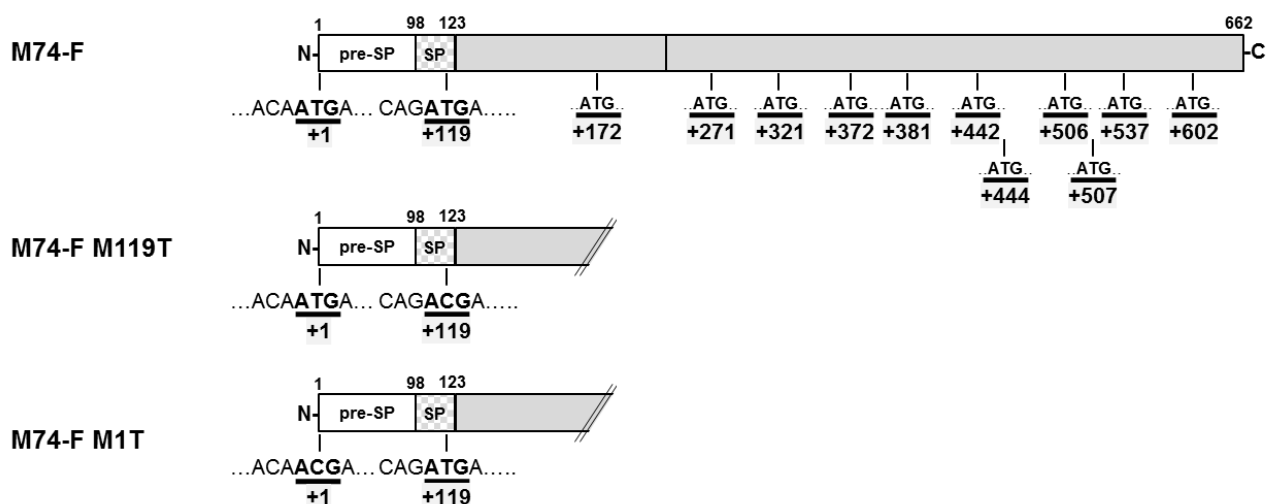


Abb. 2.15: Schematische Übersicht der *in frame* Startcodons des M74-F-Proteins sowie der beiden Startcodon-Mutanten. Alle *in frame* Startcodons sind markiert und mit der Aminosäureposition beschriftet. pre-SP: pre-Signalpeptid, SP: Signalpeptid

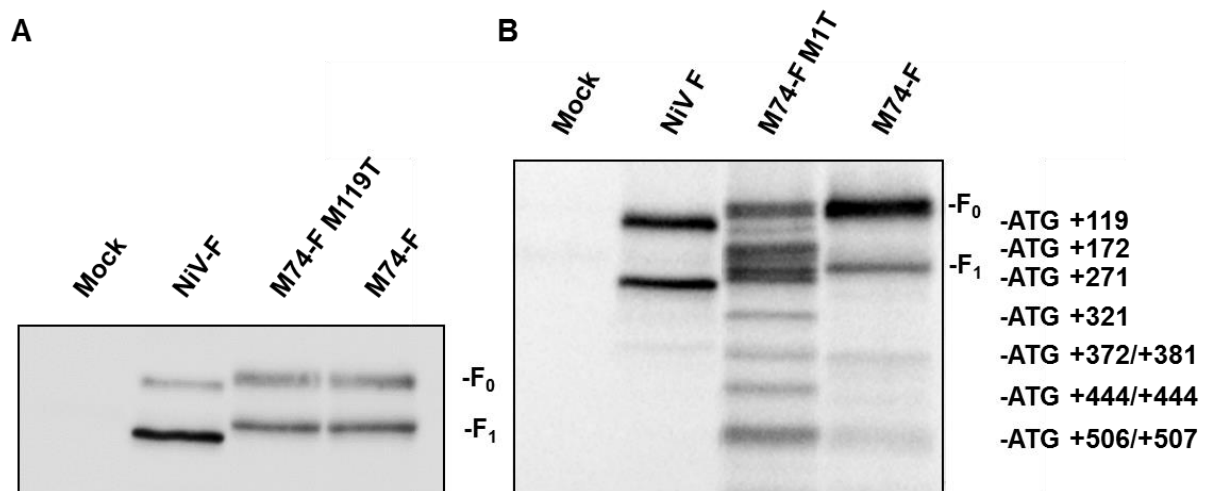


Abb. 2.16: Western Blot Analyse der M74-F M119T und M1T-Mutante. Vero-Zellen wurden mit pCAGGS-NiV-F bzw. pCAGGS-M74-F oder pCAGGS-M74-F M119T / M1T transfiziert. 24 h p.t. erfolgte eine RIPA-Zelllyse und eine anschließende Immunpräzipitation mit anti-tag Antikörpern (aus Kaninchen) (1:100-1:500). Danach wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit Hilfe anti-tag spezifischer Primärantikörpern (aus Maus), biotinylierten Sekundärantikörpern, einem Streptavidin/HRP-Komplex und Chemilumineszenz. Die Auswertung erfolgte am Chemidoc (Biorad).

In Abb. 2.16A ist zu erkennen, dass die Mutation des zweiten Startcodons nicht zu einer Veränderung des Expressionsmuster führt. Allerdings hat die Mutation des ATG an Position 1 deutliche Auswirkungen auf das Expressionsmuster (Abb. 2.16B). Die Proteinmenge ist reduziert und es erscheinen viele zusätzliche Proteinbanden von geringerer Größe, die auf eine Expression kürzerer Proteine von den folgenden *in frame* ATGs hinweist (+119, +172, +271, ...).

2.6.2 M74-F mit (*in silico*) „rectified“ Sequenz

Die Gruppe um Pernet et al. vermutete ebenfalls negativ-regulierende Funktion der langen pre-SP Sequenz und publizierte kürzlich eine sogenannte rectified (korrigierte) Sequenz M74-F-Proteins. Die Autoren vermuteten einen Sequenzierfehler in einer AT-reichen Region kurz vor dem Signalpeptid, die eine Leserahmenverschiebung zur Folge hatte. Nur dadurch wurde das ATG⁺¹ zum Genstartcodon und das M74-F-Translationsprodukt musste die lange pre-SP

Sequenz statt eines richtigen Signalpeptids enthalten. Um diesen durch „*in silico*“-Analysen aufgedeckten Fehler zu korrigieren fügten sie in die AT-reiche Region an Position 303 ein Nucleotid (Adenin) ein und setzten somit ein *out of frame* ATG an Position 98 *in frame* zum Signalpeptid. Durch diese Insertion erhielten sie ein M74-F-Protein mit einem bona fide Signalpeptid direkt am Anfang des Translationsprodukts. Dieses wurde besser exprimiert und zeigte mehr Fusionsaktivität als das von der Gruppe verwandte Codon-optimierte M74-F Wildtyp Protein (Pernet et al., 2014a).

Um dieses Ergebnis zu prüfen, klonierte ich ebenfalls die Mutante mit einer +A-Insertion an Position 303 und untersuchte die M74-F(+A)-Mutante auf Expression und Spaltung im Western Blot und auf ihre biologische Aktivität in Fusionsassays. Zusätzlich zur (+A)-Insertionsmutante wurde eine Deletionsmutante hergestellt, bei der mit den Aminosäuren 1-97 alle vorausgehenden potentiellen Startcodons und somit die gesamte pre-SP Sequenz deletiert wurde. Bei der M74-F Δ 1-97 (+A) Mutante ist somit das ATG⁺⁹⁸ zwingend der Genstart.

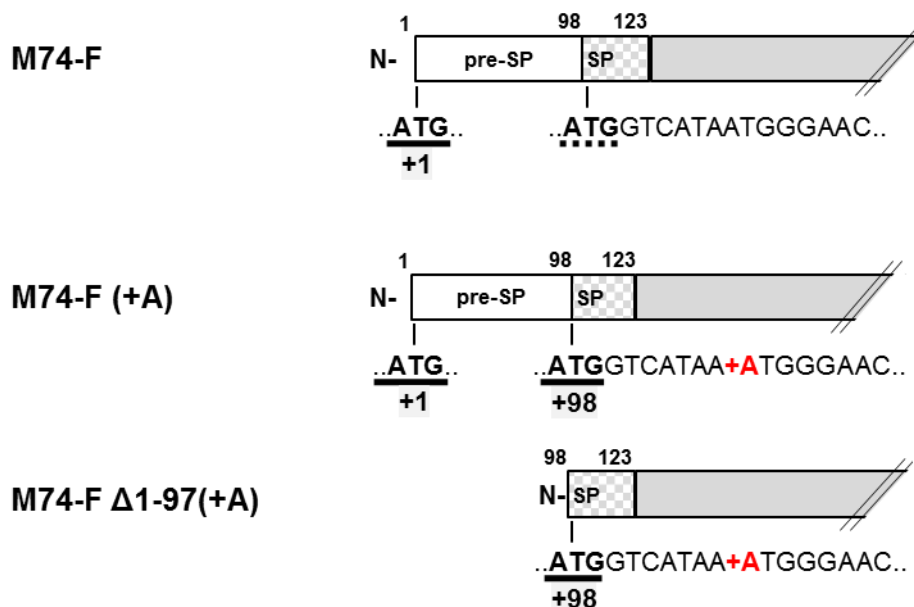


Abb. 2.17: Schematische Darstellung der M74-F (+A) Mutanten. Schwarz unterstrichen sind *in frame* ATGs, gestrichelt ist das *out of frame* ATG. In Rot das eingefügte Adenin an Position 303.

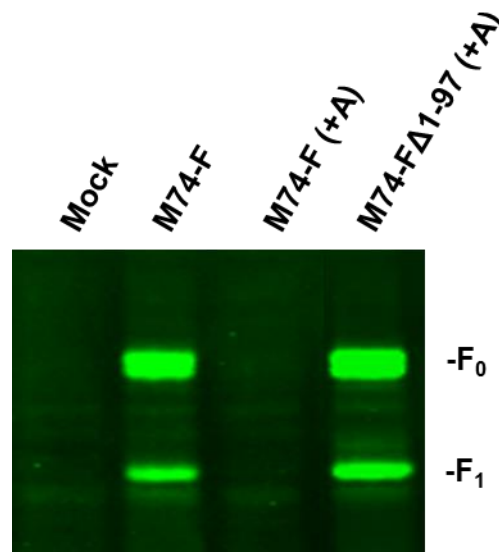


Abb. 2.18: Western Blot Analyse der M74-F (+A) Mutanten. Vero-Zellen wurden mit den aufgeführten F-Plasmiden transfiziert. 24 h p.t. erfolgte eine RIPA-Zelllyse und mit dem Zelllysät wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit Hilfe anti-tag spezifischer Primärantikörpern (aus Maus) und IRDye gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Auswertung erfolgte am Odyssey (LiCor).

Unerwarteter Weise war in den Western Blot Analysen (Abb. 2.18) die Mutante M74-F (+A) fast nicht nachweisbar. Ihr Expressionslevel ist so niedrig, dass keine Aussagen zur Spalteffizienz gemacht werden können.

Im Gegensatz zur (+A)-Insertionsmutante war die (+A)-Deletionsmutante gut nachweisbar. Allerdings war diese nicht besser exprimiert als Wildtyp M74-F. Auch die Spaltung war vergleichbar mit der des M74-F Wildtyp. Erwartungsgemäß war auch keine der beiden Mutanten in der Lage Zell-Zell-Fusion in Vero-Zellen zu induzieren (nicht gezeigt). Somit konnten die von Pernet et al. publizierten Ergebnisse für das *in silico* „rectified“ F nicht reproduziert werden.

2.6.3 GH-p28: Afrikanisches Henipavirus mit zusätzlichem Startcodon an Position 91

Die Frage, ob das pre-SP eine regulatorische Rolle für die M74-F-Expression spielt, war nach den Untersuchungen des *in silico* „rectified“ F noch offen. Aus diesem Grund war die Identifizierung der F-Sequenz (GH-p28) durch Dr. Drexler (Bonn) sehr

interessant. Im GH-p28-F-Gen befindet sich der Genstart ebenfalls 98 Aminosäuren vom Signalpeptid entfernt. Es besitzt daher auch eine pre-SP Sequenz. Jedoch befindet sich in dieser Sequenz an Position 91 ein zusätzliches Methionin und somit ein zweites *in frame* ATG. In der Sequenz des M74-F befindet sich ein Isoleucin an Position 91. Um zu testen, ob das Einfügen dieses zusätzlichen Startcodons die Expressionsrate des M74-F-Proteins verändert, haben wir im M74-F die Aminosäure an Position 91 von einem Isoleucin (ATT) in ein Methionin (ATG) mutiert (M74-F I91M). Außerdem wurde noch eine Deletionsmutante hergestellt, bei der die Aminosäuren 1-90 deletiert wurden und somit das ATG an Position 91 das erste Startcodon im F-Gen darstellte (M74-F Δ 1-90/I91M).

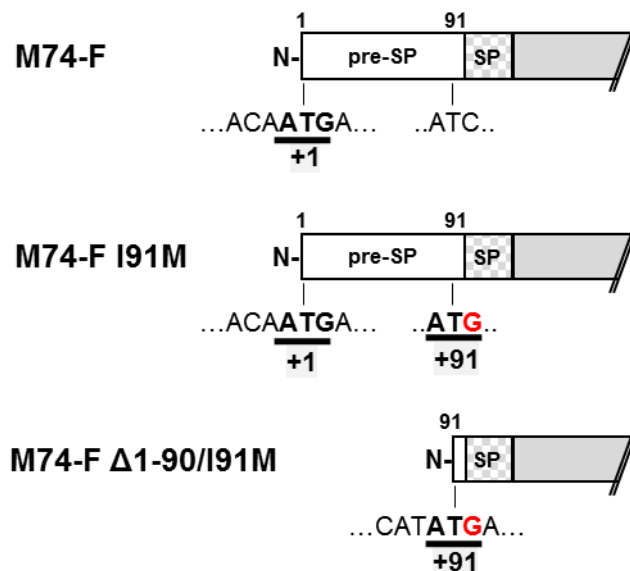


Abb. 2.19: Schematische Darstellung der I91M-Mutanten. Schwarz unterstrichen sind *in frame* ATGs, die Punktmutation ist in Rot dargestellt.

Im Western Blot sieht man, dass beide I91M-Mutanten exprimiert werden (Abb. 2.20A). Die Austauschmutante M74-F I91M zeigt jedoch keine erhöhte Expressionsrate im Vergleich zu M74-F. Die Deletionsmutante M74-F Δ 1-90/I91M scheint allerdings eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zum M74-F aufzuweisen. Die Quantifizierung des Signals für das kotransfizierte eGFP erlaubte eine Normierung der F-Proteinmenge und somit ein Vergleich der Expression unabhängig von eventuellen Unterschieden in der Transfektionseffizienz. In Abb.

2.20B wurde die Oberflächenexpression der beiden Mutanten mit der des M74-F Wildtyp verglichen. Auch in der Oberflächenbiotinylierung (siehe 5.3.2) zeigte M74-F I91M eine gleiche, die Deletionsmutante eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp M74-F.

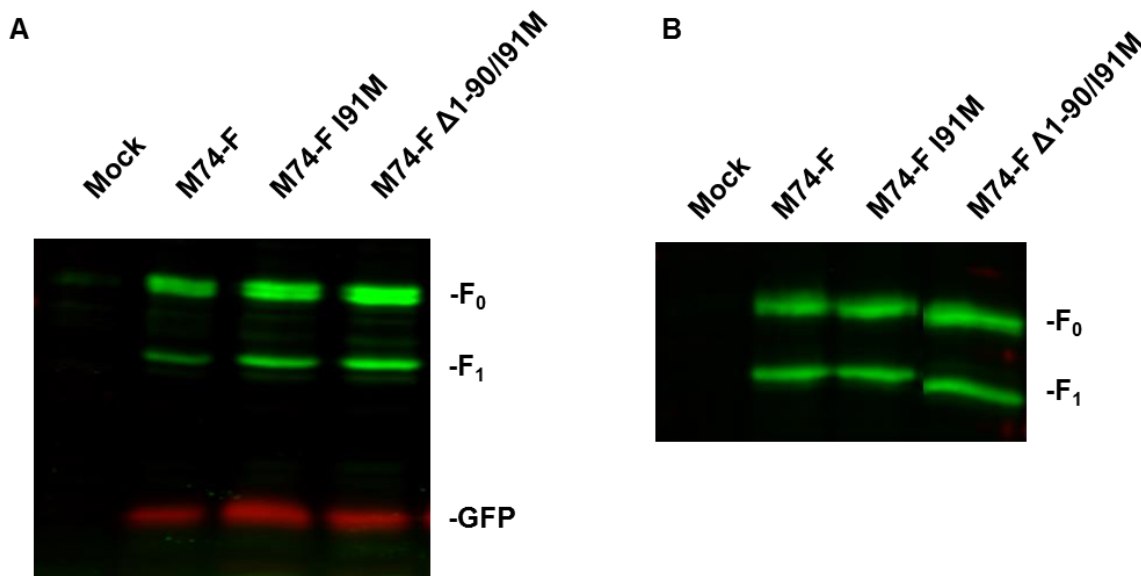


Abb. 2.20: Expression der M74-F I91M Mutanten im Vergleich zu M74-F. A) Gesamtexpression im Western Blot. Vero-Zellen wurden mit 0,8 µg pCAGGS-M74-F, pCAGGS-M74-F I91M oder pCAGGS-M74-FΔ1-90/I91M sowie 0,2 µg pCAGGS-eGFP kotransfiziert. 24 h p.t. erfolgte eine RIPA-Zelllyse und mit dem Zelllysate wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. B) Oberflächenexpression. Die Oberflächenproteine transfizierter Vero-Zellen wurden mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert und nach der Zelllyse mit NeutrAvidin-Beads gefällt. Mit den biotinylierten Proteinen wurde eine SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen und ein *Semy-Dry-Blot* durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte mit Hilfe anti-tag spezifischer Primärantikörpern (aus Maus) bzw. anti-GFP Antikörpern aus Kaninchen, sowie IRDye gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Auswertung erfolgte am Odyssey (LiCor).

2.6.5 Fusionsaktivität der I91M Mutanten

Da die Expression der M74-FΔ1-90/I91M Deletionsmutante an der Zelloberfläche erhöht war, sollte ihre biologische Aktivität im Fusionsassay untersucht werden.

Hierzu wurde sie zusammen mit dem M74-G-Protein zum einen in Vero-Zellen kotransfiziert um zu sehen, ob sie hier Fusionsaktivität erlangen und zum anderen in HypNi/1.1-Zellen kotransfiziert, um hier die Größe der Synzytien mit denen der Wildtypproteine vergleichen zu können.

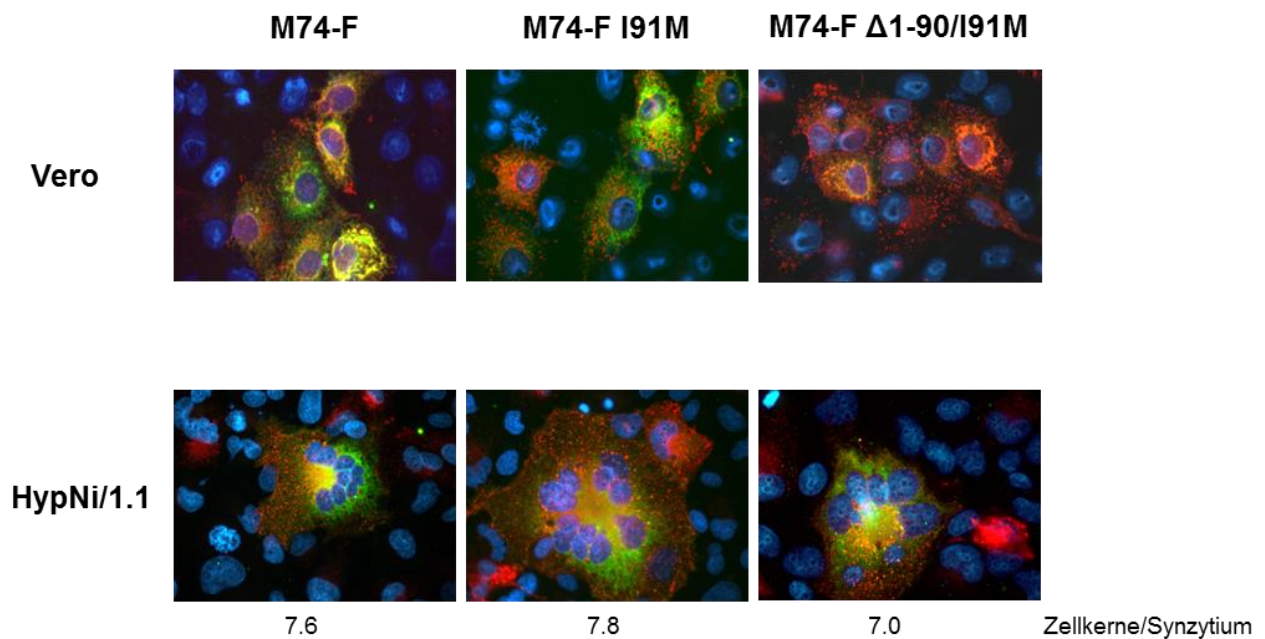


Abb. 2.21: Koexpression der M74-F I91M Mutanten mit M74-G in Vero- und HypNi/1.1-Zellen. M74-F und die beiden M74-F I91M Mutanten wurden mit M74-G in beide Zelllinien kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen mit Met/Ac 10min fixiert und permeabilisiert und danach das G-Protein mit einem anti-HA (aus Maus) und die F-Proteine mit anti-Flag Antikörper (aus Kaninchen) markiert. Darauf folgte eine Inkubation mit einem AlexaFluor488-gekoppelten anti-Maus (grün) und einem AlexaFluor568-gekoppelten anti-Kaninchen (rot) Sekundärantikörper zur Detektion der Glykoproteine. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. In HypNi/1.1-Zellen wurden die Zellkerne pro Synzytium ausgezählt und gemittelt. Auswertung mit einem Axiovert 200M-Mikroskop, 630fache Vergrößerung.

Abb. 2.21 zeigt, dass keine der beiden I91M-Mutanten in der Lage war, Zell-Zell-Fusion in Vero-Zellen zu induzieren. Trotz der zum Teil stärkeren Oberflächenexpression konnten sie auch nicht mehr oder größere Synzytien als die Wildtypproteine in HypNi/1.1-Zellen induzieren. Damit lässt sich schließen, dass ein zusätzliches Startcodon (I91M) kurz vor dem SP keine Veränderungen in der Expression mit sich bringt. Nicht einmal, wenn alle vorangehenden Startcodons inklusive des ATG⁺¹ deletiert sind. Das bedeutet, dass die Expression durch eine Verkürzung der langen pre-SP Sequenz nicht verbessert werden kann und eine regulatorische Rolle damit sehr unwahrscheinlich ist.

2.7 Charakterisierung der M74-F-aktivierenden Protease

2.7.1 Intrazelluläre Verteilung des M74-F-Proteins

Das M74-F-Protein wird in ähnlichen Mengen wie das NiV-F-Protein exprimiert, erscheint jedoch in deutlich geringeren Mengen an der Zelloberfläche. Somit lässt sich ein Unterschied im intrazellulären Transport des Proteins zur Zelloberfläche vermuten. Um den Transport direkt mit dem des NiV-F-Proteins vergleichen zu können, wurden zunächst Kolokalisationsstudien durchgeführt. Hierzu wurden Vero-Zellen auf 24-well Platten mit Deckgläsern ausgesät und mit beiden F-Proteinen kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Die beiden F-Proteine wurden über ihre unterschiedlichen tags spezifisch angefärbt.

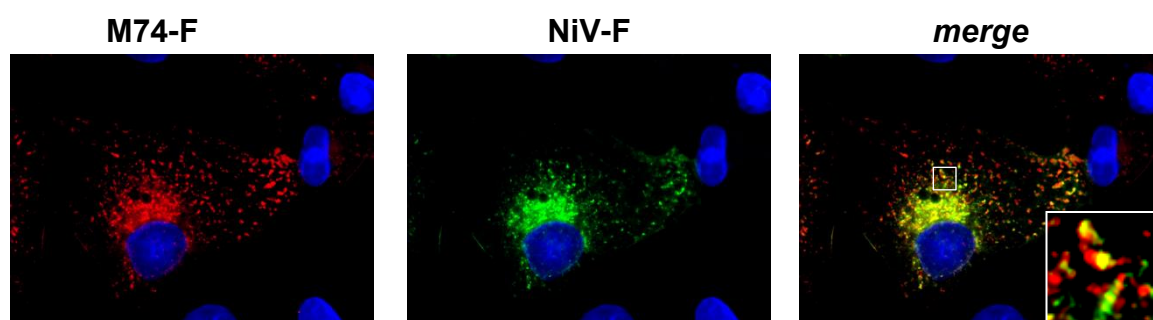


Abb. 2.22: Koexpression der beiden F-Proteine in Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit dem M74-F_{2xFlag} und dem NiV-F_{HA} kotransfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen 10 min mit Met/Ac fixiert und permeabilisiert. Danach wurden die Glykoproteine mit einem anti-HA (aus Maus) und anti-Flag (aus Kaninchen) Antikörper markiert. Darauf folgte eine Inkubation mit einem AlexaFluor488-gekoppelten anti-Maus (grün) und einem AlexaFluor568-gekoppelten anti-Kaninchen (rot) Sekundärantikörper. Somit erscheint das NiV-F Protein in grün, das M74-F Protein in rot. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI sichtbar gemacht. Aufnahme am konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5) mit Ausschnittsvergrößerung im Überlagerungsbild (*merge*).

In Abb. 2.22 ist zu sehen, dass sich die Verteilung der beiden Proteine grundsätzlich ähnelt und es Bereiche gibt, in denen das M74-F (in rot) mit dem NiV-F (in grün) kolokalisiert, welche dadurch gelb erscheinen. Doch es kommt nur zu einer partiellen Kolokalisation. Das lässt vermuten, dass der intrazelluläre Transport des M74-F

Unterschiede zu dem des NiV-F-Proteins aufweist und ersteres möglicherweise nicht durch das endosomale Kompartiment transportiert wird, was auch die beobachteten Unterschiede in der Aktivierungsspaltung erklären würde (siehe Abb. 2.10).

2.7.2 Einfluss von Inhibitoren des sekretorischen *pathways* auf die F-Aktivierung

Für die Aktivierung von Henipavirus F-Proteinen durch Cathepsin B und L müssen die Proteine einen komplexen Transportweg durchlaufen (siehe Abb. 1.8). Das F-Protein gelangt zunächst in der inaktiven Form F_0 an die Zelloberfläche und muss dann durch Clathrin-vermittelte Endozytose wieder in die Zelle internalisiert werden, um zu den Endosomen zu gelangen (1.7.4). Hier wird das Protein gespalten und wieder zurück an die Plasmamembran transportiert. Transport-Inhibitionsstudien sollten zeigen, ob das M74-F auch auf diese Endozytose angewiesen ist. Hierzu wurden MDCK-Zellen mit Sucrose behandelt und somit alle endozytotischen Wege in diesen Zellen geblockt (Daukas und Zigmond, 1985). 24 h p.t. wurden die Zellen lysiert, über Nacht eine Immunpräzipitation durchgeführt und das Präzipitat in 2x Probenpuffer mit Mercaptoethanol aufgekocht und per SDS-Page aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine im Western Blot mit anti-tag Antikörpern nachgewiesen (5.3.6).

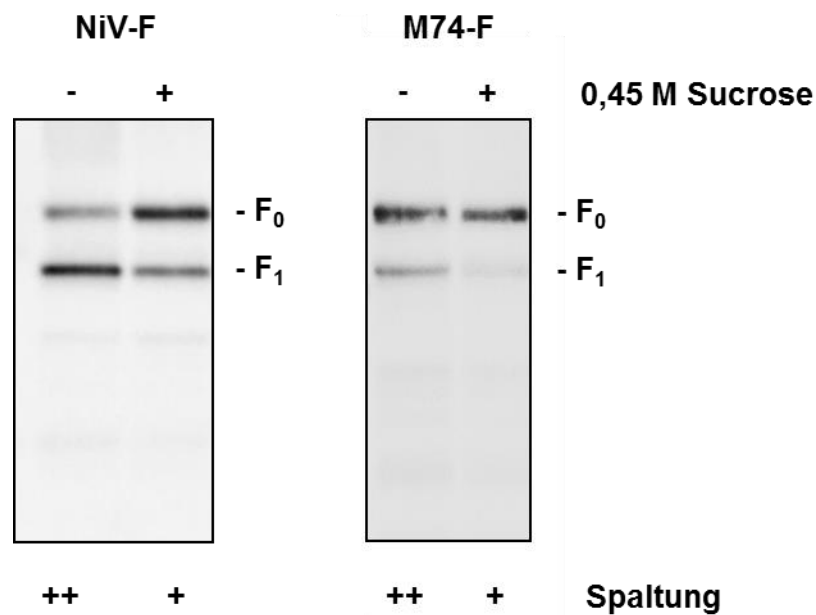


Abb. 2.23: Einfluss von Sucrose auf die Spaltung der Fusionsproteine. MDCK-Zellen wurden mit den F-kodierenden Plasmiden transfiziert und für 24 h in An- oder Abwesenheit von 0,45 M Sucrose inkubiert. Nach RIPA-Lyse und Immunpräzipitation erfolgten eine SDS-Page und ein *Semy-Dry-Blot*. Der Nachweis erfolgte über einen anti-tag Antikörper (aus Maus). Anschließend erfolgte die Inkubation mit biotinylierten Sekundärantikörpern und ein Nachweis mit Strep/HRP am Chemidoc.

Wie in Abb. 2.23 zu sehen, hat die Behandlung der MDCK-Zellen mit Sucrose (+) zu einer verringerten NiV-F-Spaltung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (-) geführt. Auch bei den mit M74-F transfizierten Zellen ist durch die Sucrosebehandlung eine deutliche Reduktion der Spaltung zu erkennen. Daraus kann man schließen, dass auch das M74-F-Protein auf die Internalisierung durch Endozytose angewiesen ist um an den Ort der Spaltung zu gelangen.

Um den Transportweg und das Kompartiment der Spaltung näher einzugrenzen, erfolgten weitere Inhibitionsstudien mit Monensin. Monensin blockt den Transport vom medialen zum trans-Golgi (Griffiths et al., 1983). Somit bleiben alle Proteine im Golgi hängen und es lässt sich untersuchen, ob die Spaltung vor oder nach dem Golgi erfolgt. Um die eventuell zelltoxischen Effekte der Inhibitoren zu minimieren, wurden die folgenden Inhibitionsstudien nicht mehr in Kombination mit einer Western Blot Analyse sondern einer *Pulse Chase* Analyse durchgeführt. Hierbei müssen die Inhibitoren nicht 24 Stunden wie beim Western Blot, sondern lediglich 8 h auf den Zellen bleiben. Die 8 Stunden wurden gewählt, da dies aus den vorausgegangenen

Pulse Chase Experimenten der Zeitpunkt mit der besten Spalteffizienz des M74-F-Proteins war. Für diesen Inhibitionsversuch wurden die transfizierten Zellen nach einem *Pulse* von 45 min für weitere 8 h inkubiert, wobei das Monensin dem Aushunger-, Markierungs- und *Chase*-Medium zugesetzt wurde.

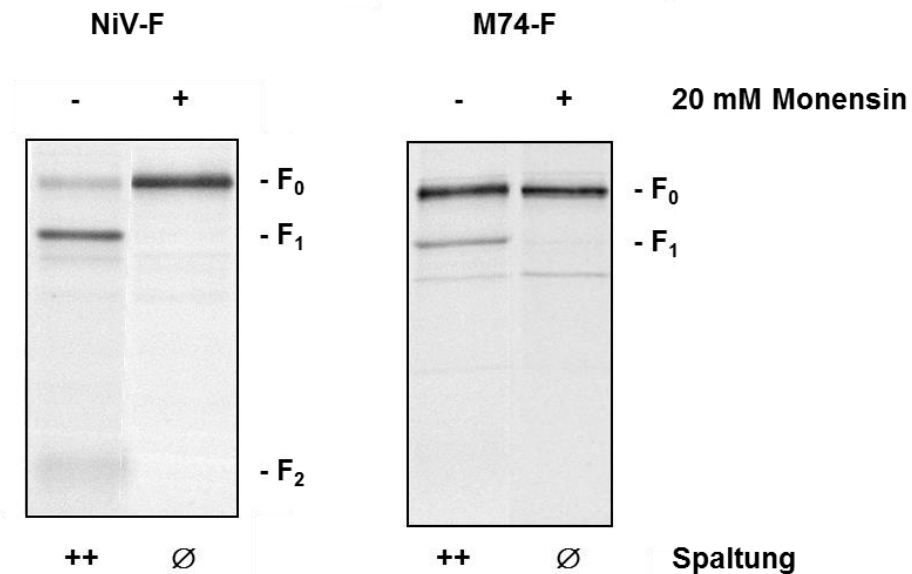


Abb. 2.24: Einfluss von Monensin auf die Spaltung der Fusionsproteine. MDCK-Zellen wurden mit NiV-F_{HA} oder M74-F_{2xFlag} transfiziert und 24 h p.t. in Ab- und Anwesenheit des Inhibitors Monensin (20 mM) im Aushunger, *Pulse*- und *Chase*-Medium mit (³⁵S)-Promix radioaktiv markiert. Auf 45-minütigen *Pulse* folgte ein 8 h *Chase*. Nach Zellyse wurden die F-Proteine immunpräzipitiert, in einer SDS-Page unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

In Abb. 2.24 sieht man den deutlichen Einfluss von Monensin auf die Spaltung. Sowohl die NiV-F- als auch die M74-F-Spaltung ist vollständig verhindert. Dies zeigt eindeutig, dass die M74-F-Spaltung nach dem Transport durch das ER und den Golgi-Apparat erfolgt.

2.7.3 pH-Abhängigkeit der M74-F-Spaltung

Die Inhibitionsversuche mit Sucrose und Monensin haben verdeutlicht, dass das M74-F-Protein erst nach dem Durchlaufen des Golgi-Apparates wahrscheinlich in Endosomen gespalten wird. Als nächstes sollte geklärt werden, ob M74-F wie das NiV-F-Protein von den pH-abhängigen Proteasen Cathepsin B und L im Endosom gespalten wird. Der pH-Wert in den endosomalen Kompartimenten liegt bei pH 6,6 bis pH 4 und es ist bekannt, dass schwache Basen wie Ammoniumchlorid (NH_4Cl) die Ansäuerung der Endosomen verhindern können (Oda und Ikehara, 1985). Deshalb sollte getestet werden, ob eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes einen Einfluss auf die M74-F-Spaltung hat. Hierfür wurden MCDK-Zellen, die 24 h zuvor mit den F-kodierenden Plasmiden transfiziert worden waren, ohne (-) und mit (+) 50 mM NH_4Cl metabolisch markiert und für weitere 8 h ohne und mit NH_4Cl inkubiert. Nach der Zelllyse wurden die F-Proteine immunpräzipitiert, in einem SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Dabei zeigt sich, dass nach Inkubation mit 50 mM NH_4Cl die Spaltung des NiV-F-Proteins vollständig geblockt ist. Auch für das M74-F-Protein ist keine Spaltung mehr zu erkennen (Abb. 2.25). Somit scheint die Ansäuerung des endosomalen Kompartimentes für die Spaltung und Aktivierung des M74-F wie auch für das NiV-F essentiell zu sein.

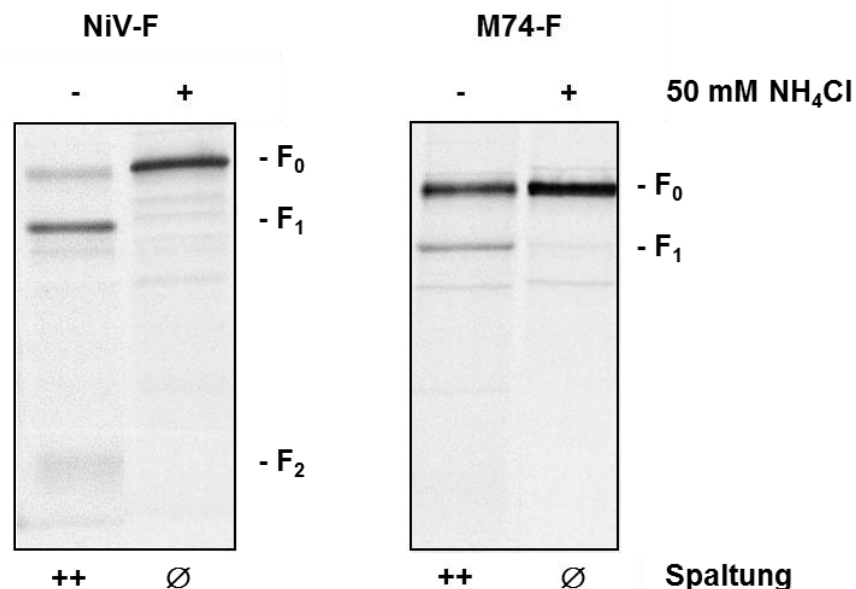


Abb. 2.25: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Spaltung der Fusionsproteine. MDCK-Zellen wurden mit NiV-F_{HA} oder M74-F_{2xFlag} transfiziert und 24 h p.t. in Ab- und Anwesenheit von NH_4Cl (50 mM) im Aushunger-, Pulse- und Chase-Medium mit (^{35}S)-Promix radioaktiv markiert. Nach 45 minütiger radioaktiver Markierung wurden die Zellen 8 h weiter inkubiert. Radioaktiv markiertes F-Protein wurde nach RIPA-Lyse immunpräzipitiert, einer SDS-Page unterzogen und autoradiographisch nachgewiesen.

2.7.4 Einfluss von Cathepsin-Inhibitoren auf die proteolytische Prozessierung des M74-F-Proteins

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die M74-F-Spaltung pH-abhängig erfolgt, sollte getestet werden, ob es wie NiV-F durch die Cathepsine B und L gespalten wird. Die beiden Cathepsine gehören zur Gruppe der Cysteinproteasen, welche die größte Gruppe der endosomalen/lysosomalen Proteasen ausmachen (Honey und Rudensky, 2003). Diese sind durch den membrangängigen Cysteinprotease-Inhibitor E64d hemmbar. Um die M74-F-Spaltung durch Cathepsine zu untersuchen, wurden MCDK-Zellen mit den F-kodierenden Plasmiden transfiziert und 24 h p.t. ohne oder mit 20 μ M E64d metabolisch markiert. Der Inhibitor wurde ebenfalls zum Aushunger-, Markierungs- und *Chase*-Medium zugesetzt und da er in DMSO gelöst war, wurde das gleiche Volumen DMSO auf die Kontrollzellen gegeben um einen Einfluss des DMSO auszuschließen. Nach 8 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und die F-Proteine immunpräzipitiert. Die Auftrennung im SDS-Gel erfolgte unter reduzierenden Bedingungen und die Spaltung der Proteine wurde mittels Autoradiographie analysiert.

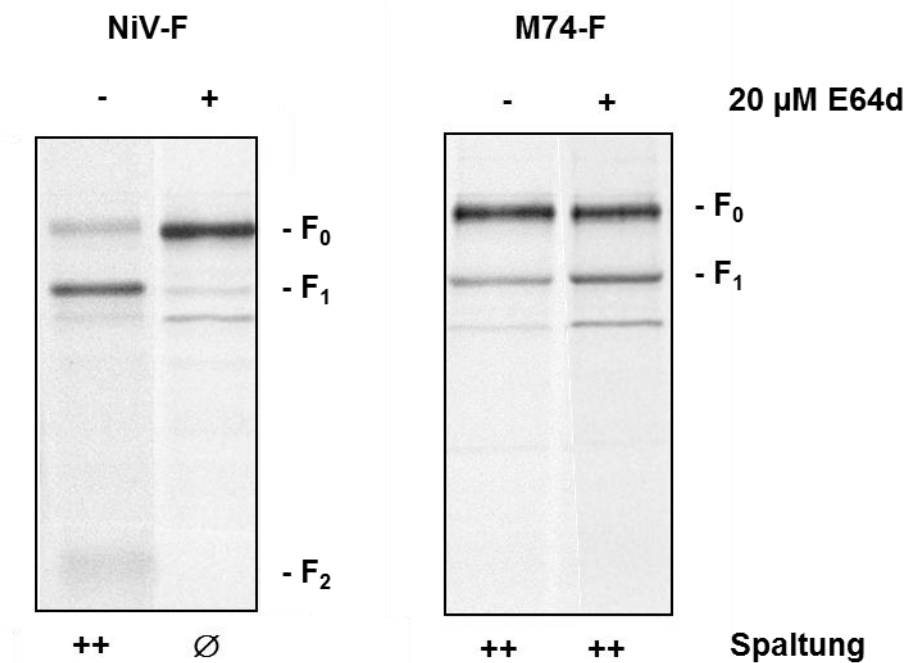


Abb. 2.26: Einfluss des Cysteinproteaseinhibitors E64d auf die Spaltung der Fusionsproteine. Mit NiV-F_{HA} oder M74-F_{2xFlag} transfizierte MDCK-Zellen wurden 24 h p.t. in Ab- und Anwesenheit des Cysteinproteaseinhibitors E64d (20 μ M) im Aushunger-, *Pulse*- und *Chase*-Medium mit (³⁵S)-Promix radioaktiv markiert. Nach 45 min *Pulse* erfolgte ein 8 h *Chase*. Nach der Zellyse wurden die F-Proteine immunpräzipitiert, in einer SDS-Page aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen.

Abb. 2.26 zeigt überraschenderweise, dass die Inkubation mit dem Cysteinprotease-Inhibitor E64d keinen Einfluss auf die M74-F-Spaltung hat. Die Menge an Spaltprodukt F_1 hat durch die Zugabe von E64d nicht abgenommen. Die Funktionalität des Inhibitors beweist die sehr deutliche Reduktion der NiV-F-Spaltung durch Zugabe von E64d. Dies deutet darauf hin, dass die M74-F-Spaltung zwar pH-abhängig ist, aber nicht durch die Cysteinproteasen Cathepsin B und L erfolgt.

Die Cathepsin-unabhängige Aktivierung scheint nicht Zelltyp-spezifisch zu sein, denn die Inhibitionsversuche zeigten identische Ergebnisse in MDCK-, Vero- und HypNi/1.1-Zellen (nicht gezeigt). Auch die Inkubation mit einem spezifischen Cathepsin L Inhibitor (CatLIII) konnte die Spaltung des M74-F nicht verhindern (nicht gezeigt).

Somit unterscheidet sich das M74-F von NiV-F nicht nur hinsichtlich der Spalteffizienz, sondern auch in der Nutzung zellulärer Aktivierungsproteasen. Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der M74-F-spaltenden Protease sind in näherer Zukunft geplant.

III. Diskussion

Bei Koexpression der beiden Glykoproteine F und G des neu entdeckten afrikanischen Henipavirus GH-M74a kam es nur in einer einzigen Zelllinie (HypNi/1.1) zur Synzytienbildung. Dies wies auf eine limitierte Funktionalität der beiden Glykoproteine hin. Der funktionelle Defekt lag dabei vor allem im F-Protein, denn dieses konnte auch bei Koexpression mit dem voll funktionsfähigen NiV-G-Protein keine Fusion vermitteln (heterotypischer Fusionsassay Abb. 2.6). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur genaueren Charakterisierung des funktionellen Defekts des M74-F sind im Folgenden diskutiert.

3.1 Fusionsaktivität in verschiedenen Zelllinien

Für eine effektive Henipavirus-Infektion ist die Fusion der Virushülle mit der Wirtszelle beim Viruseintritt und die Zell-Zell-Fusion für die Virusausbreitung von essentieller Bedeutung. Nur so kann das Genom in neue Wirtszellen gelangen und dort replizieren. Für die Fusionsprozesse werden nur die beiden Glykoproteine F und G benötigt, weshalb man die Fusionsaktivität durch einfache Kotransfektion der beiden Glykoproteine in Rezeptor-tragende Zelllinien untersuchen kann. In dieser Arbeit wurde eine Reihe Henipavirus-permissiver Zelllinien für solche Fusionsassays eingesetzt, doch zu Zell-Zell-Fusion durch die M74-Glykoproteine kam es nur in HypNi/1.1-Zellen, einer Nierenzelllinie eines Flughundes der Gattung *Hypsignathus monstrosus*. Krüger et al. konnten noch in einer weiteren Flughundzelllinie (EidNi/41) Zell-Zell-Fusion beschreiben und auch Pernet et al. fanden mit U87-Zellen (humane Glioblastomazellen) noch eine weitere Zelllinie, in der es nach Koexpression der beiden M74-Glykoproteinen zur Zell-Zell-Fusion kam. Dennoch scheint es insgesamt nur sehr wenige, ausgewählte Zelllinien zu geben, in denen die M74-Glykoproteine Fusionsaktivität zeigen. Somit sind die M74-Glykoproteine zwar grundsätzlich in der Lage, Zell-Zell-Fusion zu induzieren, doch ist ihre Aktivität im Vergleich zu den NiV-

Glykoproteinen stark eingeschränkt. Warum es in den ausgewählten Zelllinien zur Synzytienbildung kommt, ist unklar.

Die Overlay-Fusionsassays sprechen jedoch dafür, dass zumindest die HypNi/1.1-Zellen im Vergleich zu Vero-Zellen erhöhte fusogene Eigenschaften besitzen. Sie können fusionieren, auch wenn die Glykoproteine in Vero-Zellen exprimiert wurden (Abb. 2.8). Somit scheint die Expression der Glykoproteine in Vero-Zellen, die selbst nicht fusionieren, zu einer funktionellen Expression auf der Zelloberfläche zu führen, die bei Kontakt mit den HypNi/1.1-Zellen eine Zell-Zell-Fusion induzieren kann. Gründe hierfür könnten zum einen in einer erhöhten Rezeptorexpression liegen. So könnten HypNi/1.1-Zellen mehr EphrinB2 an der Zelloberfläche aufweisen und somit die G-Bindung und Fusion begünstigen. Für diese Erklärung würde sprechen, dass früher bereits gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von EphrinB2 zu einer verstärkten/erhöhten Synzytienbildung durch henipavirale Glykoproteine führen kann (Thiel et al., 2008). Allerdings zeigen vergleichende qPCR-Analysen der HypNi/1.1- und Vero-Zellen zumindest keine signifikanten Unterschiede in der EphrinB2-mRNA-Expression (Laura Behner, unveröffentlicht). Ob sich die Rezeptormengen auf Proteinebene unterscheiden, müsste man allerdings noch mit einer FACS-Analyse untersuchen. Eine alternative Ursache für die Fusion in HypNi/1.1-Zellen könnte in der Membranzusammensetzung der Zellen liegen. So könnte die Lipidzusammensetzung der Zellmembran eine erhöhte Fluidität und somit eine erhöhte Bereitschaft zur Fusion aufweisen. Dies könnte durch unterschiedliche oder erhöhte Mengen an Sphingolipiden in der Membran entstehen, deren Aufgaben die Regulation der Membranfluidität beinhalten (van Meer und Lisman, 2002; Slotte et al., 1999).

3.2 Heterotypische Fusionsaktivität

Es ist bekannt, dass die Glykoproteine von HeV und NiV untereinander ausgetauscht werden können, ohne die Zell-Zell-Fusion einzuschränken. Solche heterotypischen Fusionsassays sind auf das Genus der Henipaviren beschränkt, denn sie

funktionieren nicht in Kombination mit Glykoproteinen von Morbilliviren, z.B. von Masernviren oder von CDV (Bossart et al., 2002). Die Beobachtung, dass im heterotypischen Fusionsassay das M74-G-Protein zusammen mit dem NiV-F-Protein Synzytien induzieren kann (Abb. 2.6c), ist somit ein funktionelles Indiz dafür, dass das M74 Virus zum Genus der Henipaviren gezählt werden kann. Bisher war dies lediglich auf Grund von Sequenzhomologien möglich (Drexler et al., 2012). Die erfolgreiche Bindung des M74-G-Proteins an den Henipavirus-Rezeptor EphrinB2 konnte bereits zuvor durch Kopräzipitationsstudien und Koimmunfluoreszenzen gezeigt werden (Weis et al., 2014). Aufgrund der Aktivität des M74-G-Protein im heterotypischen Fusionsassay muss man außerdem davon ausgehen, dass es nach Rezeptorbindung eine Konformationsänderung durchläuft und seine *fusion helper function* erfüllt, indem es die Konformationsänderung im NiV-F-Protein anregt. Somit erscheint das M74-G-Protein grundsätzlich als funktionell. Dennoch, die M74-G induzierten Synzytien waren deutlich kleiner als die durch NiV-G induzierten, was auf kleinere Defekte im M74-G hinweist (Abb. 2.6c). diese funktionellen Unterschiede zwischen dem M74- und dem NiV-G-Protein werden derzeit von Laura Behner im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersucht. Im Gegensatz zum M74-G kann das M74-F-Protein zusammen mit dem funktionellen NiV-G keine Synzytienbildung in Vero-Zellen induzieren (Abb. 2.6b). Dies weist darauf hin, dass im M74-F-Protein schwerwiegende funktionelle Defekte vorliegen.

3.3 Ineffektiver F-Oberflächentransport und Spaltung

Für eine effektive Funktion des Fusionsproteins muss es in ausreichender Menge in der aktiven, gespaltenen Form an der Zell- bzw. Virusoberfläche vorhanden sein. Aufgrund des erfolgreichen Nachweises von M74-F mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot Analysen (Abb. 2.2) konnte ausgeschlossen werden, dass die mangelnde Fusionsaktivität auf einen generellen Defekt in der F-Expression zurückzuführen ist. Allerdings war ein deutlicher Unterschied zu NiV-F an

der Zelloberfläche zu erkennen. In der Oberflächenbiotinylierung war kaum M74-F nachweisbar (Abb. 2.9).

Auch die Spaltung des M74-F-Proteins war deutlich verlangsamt und sehr viel ineffizienter (Abb. 2.10), obwohl die Aminosäuresequenz an der Spaltstelle sehr homolog zu der anderer Henipaviren ist (GNAR_FAG) und somit die grundsätzlichen Anforderungen für eine Aktivierung durch Cathepsin B oder L erfüllt. Da die F-Spaltung in sauren, endosomalen Kompartimenten jedoch von einem effektiven Transport zur Zelloberfläche, gefolgt von einer Clathrin-vermittelten Endozytose abhängig ist (Diederich et al., 2005, 2012; Pager et al., 2006; Popa et al., 2012), muss man vermuten, dass die ineffektive M74-F-Spaltung aus einem fehlgeleiteten intrazellulären Transport resultiert. Ein Indiz für deutliche Unterschiede im intrazellulären Transport ist die geringfügige intrazelluläre Kolo-kalisation des M74-F-Proteins mit dem NiV-F (Abb. 2.15), das vor allem in *early-recycling* Endosomen, nicht aber in späten, lysosomalen Kompartimenten lokalisiert ist (Diederich et al., 2012). Grund für die verminderte M74-F Oberflächenexpression könnte eine Fehlfaltung des Proteins sein, die dazu führt, dass es im ER akkumuliert und zum großen Teil erst gar nicht an die Zelloberfläche gelangt, sondern aggregiert oder direkt abgebaut wird (Hebert and Molinari, 2007). Alternativ könnte der Endozytoseweg gestört sein mit der Folge, dass das M74-F-Protein nicht an den richtigen Ort für die Spaltung gelangt und deshalb nicht über frühe oder *recycling* Endosomen transportiert wird, sondern direkt in späte Endosomen und Lysosomen gelangt und hier festgehalten wird. Jedoch gibt es in den *Pulse Chase* Analysen keine Anzeichen auf eine erhöhte lysosomale Degradation des M74-F-Proteins. Zumindest über einen Zeitraum von 12 h scheint das M74-F genauso stabil zu bleiben wie das fusionsaktive NiV-F (Abb. 2.10).

3.4 M74-F-Spaltung durch Cathepsine

Neben dem zellulären Rezeptor ist die Aktivierungsprotease ein wichtiger Faktor, der den Gewebetropismus und das Wirtsspektrum einer Virusinfektion beeinflussen kann

(Klenk und Garten, 1994; Maisner et al., 2000; Tashiro et al., 1988,1999). Da die Henipavirus-F spaltenden Proteasen Cathepsin B und L sehr konserviert sind und ubiquitär exprimiert werden, können die pathogenen Henipaviren (HeV, NiV) in fast allen Zellen aktiviert werden. Wie die Inhibitionsstudien (Abb. 2.23 – 2.26) gezeigt haben, benötigt die M74-F- wie die NiV-F-Spaltung ebenfalls Endozytose und einen sauren pH-Wert, jedoch wird das M74-F nicht durch die Cathepsine B und L gespalten. Dies ist ein wichtiger Unterschied. Denn wird das M74 Fusionsprotein durch eine andere Protease gespalten, so könnte deren Expressionsmuster Unterschiede in Bezug auf das Gewebe oder den Wirt aufweisen und somit einen veränderten Zelltropismus oder Wirtstropismus bedingen. Dass das M74-F trotz der für Cathepsin B und L passenden Spaltstelle durch eine andere Protease gespalten wird, könnte auch darauf hinweisen, dass das M74-F nicht die endosomale Kompartimente erreicht, in denen die beiden Cathepsine aktiv sind, sondern in anderen Zellkompartimenten (ER, Golgi, Lysosomen) gespalten wird. Als Aktivierungsproteasen kommen hierbei verschiedene Proteasen in Frage, z.B. die Aspartatproteasen Cathepsin D und E oder die Serinproteasen Cathepsin A und G. Um die Aktivierungsprotease zu identifizieren, wurden bereits einige Inhibitionsstudien mit Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor), AEBSF und Aprotinin (Serinproteaseinhibitoren) durchgeführt. Aber bisher konnte mit keinem spezifischen Proteaseinhibitor die Spaltung inhibiert werden. Allerdings fehlten bei diesen Versuchen die Positivkontrollen für die Funktionalität der eingesetzten Inhibitoren.

3.5 Veränderung im Startcodon des M74-F

In der Sequenz des M74-F folgt das Signalpeptid nicht direkt auf das Startcodon, sondern befindet sich erst bei Aminosäure 98-123 (Pernet et al., 2014, Abb. 2.17). Dieser mit 98 Aminosäuren im Vergleich zum NiV-F deutlich verlängerte N-Terminale Bereich vor dem Signalpeptid (pre-SP) könnte der Grund für die ineffizientere Expression des Proteins sein. Diese ineffiziente F-Expression und Spaltung des

M74-F im Vergleich zum NiV-F veranlasste Pernet et al. dazu, die Sequenz des M74-F-Proteins auf Basis einer *in silico* Analyse zu korrigieren.

Bei Analyse der Sequenz fanden sie in der Nähe eines *out of frame* Startcodons kurz vor dem Signalpeptid eine AT-reiche Region, die schwer zu Sequenzieren und daher anfällig für Sequenzierungsfehler sein könnte. Sie fügten an dieser Stelle (Nucleotidposition 303) ein zusätzliches Nucleotid (A) ein, wodurch das ATG an Position 98 zu einem *in frame* ATG wurde (Abb. 2.17). Dadurch generierten sie ein F-Protein, welches nicht nur besser exprimiert, sondern auch effizienter gespalten wurde als ihr M74-F Wildtyp Protein. Zusätzlich konnten sie mit dieser F(+A)-Mutante Zell-Zell-Fusion in U87-Zellen nachweisen (Pernet et al., 2014a). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese M74-F(+A)-Mutante ebenfalls kloniert, doch konnten die beobachteten Ergebnisse nicht reproduziert werden. Die M74-F(+A)-Mutante war in Western Blot Analysen kaum nachweisbar und zeigte auch keine Fusionsaktivität in Koexpression mit M74-G oder NiV-G in Vero-Zellen. Erst eine Deletion der Aminosäuren 1 - 97 führte zu einer nachweisbaren Expression im Western Blot, jedoch nicht zu einer Erhöhung der Expression und Spaltung im Vergleich zu M74-F Wildtyp. Auch konnte keine erhöhte Fusionsaktivität dieser Mutante nachgewiesen werden. Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse liegt wohl im unterschiedlichen Ursprung der beiden M74-F-Proteine. In dieser Arbeit wurde die cDNA der Arbeitsgruppe Drosten genutzt, die direkt von der RNA aus den Flughund-Proben abgeleitet war. Die Gruppe um Pernet ließ sich auf Basis der veröffentlichten M74-Datenbanksequenz ein Codon-optimiertes Gen synthetisieren. Unsere Vermutung ist, dass diese Codon-Optimierung das Gen wohl so stark verändert hat, dass es schlechter exprimiert und gespalten wird, als das natürliche M74-F-Gen, das wir benutzen. Dies kann an veränderten mRNA-Sekundärstrukturen (Kozak, 2005) aber auch an einer suboptimalen *codon pair bias* liegen. Für eine gute Expression ist nämlich nicht nur das Vorhandensein optimaler Triplets für eine Aminosäure nötig, sondern auch eine bestimmte Kombination der Triplets. Eine ungünstige Kombination kann ganze Viren attenuieren (Coleman et al., 2008). Dies wird häufig bei der Codon-Optimierung nicht berücksichtigt. Außerdem wurde von Pernet et al. ein AU1-tag an den C-Terminus gehängt. Auch das könnte ein Grund für die geringere Expression sein, denn der AU1-tag enthält Tyrosine in einem klassischen

Endozytosesignal (DTYRYI). Wir haben uns für die Verwendung des M74-F mit einem 2xFlag-tag entschieden, der keine Tyrosine enthält, denn es ist beschrieben, dass Tyrosine im zytoplasmatischen Tail eines Henipavirus-F-Glykoproteins den intrazellulären Transport und die Endozytose und damit auch die Fusionsaktivität verändern können (Popa et al., 2011). Der AU1-tag besitzt zwei Tyrosine und könnte somit die Endozytose verstärken, was dann zu einer verminderten Oberflächenexpression des AU1-markierten M74-F von Pernet et al. im Vergleich zu unserem Flag-markierten Protein führt. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste man beide F-Proteine im direkten Vergleich analysieren.

Die von Pernet et al. postulierte Möglichkeit eines Sequenzierfehlers bei M74 konnte die Gruppe von Herrn Prof. Dr. Drosten auch inzwischen ausräumen, denn Sequenzen weiterer F-Proteine aus den afrikanischen Flughunden zeigten den gleichen AT-Bereich, ohne zusätzliche Nucleotidinsertion. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei allen durchgeführten Sequenzierungen der RNA-Proben immer der identische Sequenzierfehler aufgetreten ist, ist eigentlich auszuschließen. Somit muss man schließen, dass sowohl das inaktivere, Codon-optimierte M74-F als auch das „*rectified*“ M74-F rein künstliche Konstrukte mit künstlich erschaffenen Eigenschaften sind und das M74-F, wie wir es benutzten, sehr wahrscheinlich dem natürlich vorkommenden M74-F-Protein entspricht. Somit ist der *open reading frame* des M74-F tatsächlich 662 Aminosäuren lang und enthält eine 98-Aminosäuren lange pre-SP Sequenz nach dem ersten Startcodon. Auch wenn das bei anderen Henipaviren nicht so ist, gibt es andere Paramyxovirus-F-Proteine, die ebenfalls diese Region verlängert haben, wie etwa das Hundestaupervirus CDV (canine distemper virus) (Cherpillod et al., 1999; Von Messling and Cattaneo, 2002). Das CDV-F-Protein ist ebenfalls 662 Aminosäuren lang und sein Signalpeptid endet an Position 137. Es konnte gezeigt werden, dass die pre-SP Region regulatorische Funktionen besitzt, da eine Deletion in der Hochregulation der Fusionsaktivität des CDV-F resultiert (von Messling and Cattaneo, 2002). Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten scheint die pre-SP Sequenz im M74-F keine regulatorische Funktion zu haben, denn wir konnten durch die Deletion dieses Bereiches in zwei weiteren

Mutanten (M74-F Δ 1-90/I91M und M74-F Δ 1-97 (+A)) die Fusionsaktivität von M74-F nicht verbessern.

Die Charakterisierung der verschiedenen Startcodon-Mutanten zeigten insgesamt, dass das Einfügen eines zusätzlichen Startcodons kurz vor dem Signalpeptid, wie es in dem natürlichen Isolat (GH-p28) oder im angeblichen „rectified“ F vorkommt, keinen Vorteil für die Proteinexpression und Funktionalität haben.

3.6 Identifikation neuer Henipaviren

Bis vor wenigen Jahren hatte man geglaubt, dass Henipaviren nur im Südostasiatischen Raum (NiV) und Australien (HeV) vorkommen. Dazu passt, dass Flughunde der Gattung *Pteropus*, die als Virusreservoir fungieren, nur in Asien und Australien beheimatet sind. Im bekannten Verbreitungsgebiet der Hendra- und Nipahviren wurde jüngst ein bisher unentdecktes Virus gefunden. Im Jahr 2012 konnte ein neues Virus aus Urinproben australischer Flughunde isoliert werden. Dieses Virus wurde nach dem Isolationsort Cedar-Virus benannt und ist nach aktuellen Untersuchungen nicht humanpathogen (Marsh et al., 2012). Da seine Genomgröße (18162 nt) vergleichbar mit HeV und NiV ist und es ebenfalls EphrinB2 (jedoch nicht EphrinB3) als Rezeptor benutzt, wurde es als dritter Vertreter dem Genus Henipaviren eingeordnet. Die Charakterisierung des Cedarvirus zeigte das Fehlen des RNA-Editing des P-Gens. Deshalb wird kein V-Protein exprimiert, das normalerweise die Immunantwort des Wirts blockiert (Lamb and Parks, 2007). Fehlt das V-Protein kommt es zu einer Hochregulation der IFN β -mRNA (Marsh et al., 2012). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich der Hauptgrund für die fehlende Humanpathogenität des Cedarvirus.

Im Jahr 2009 gelang es der Gruppe von Prof. Dr. Christian Drosten aus Bonn in Afrika Henipavirus-ähnliche RNA aus Flughunden zu isolieren. Sie waren damit nicht nur die ersten, denen es gelang Henipavirus-RNA außerhalb von Asien und Australien zu isolieren, sondern sie haben diese RNA auch aus einer anderen

Flughund Gattung isoliert. Flughunde der Gattung *Pteropus* kommen in Afrika nicht vor. Hier findet man fruchtfressende Flughunde der Gattung *Eidolon helvum*, die wiederum nicht im asiatischen Raum vorkommen und somit nicht in Kontakt mit den *Pteropus* Flughunden stehen. Flughunde der Gattung *Eidolon* sind nur in Afrika und dem Nahen Osten verbreitet (O'Brien, 2011). Diese leben in direktem Kontakt zu den Menschen, werden gejagt und als *bushmeat* verzehrt (Drexler et al., 2009). Dass hierbei die Gefahr einer Infektion durch Kontakt mit rohem Fleisch besteht, sehen wir gerade bei der aktuellen Ebola-Epidemie, bei der Patient 0 ein 2-jähriger Junge war, der sich wahrscheinlich beim Verzehr eines ungenügend gekochten Flughund infiziert hat (Baize et al., 2014). Neueste Studien konnten zeigen, dass bis zu 48 % der *Eidolon helvum* Flughunde neutralisierende Antikörper gegen Henipaviren besitzen, was für eine hohe Durchseuchungsrate spricht (Pernet et al., 2014b). Es gibt bereits Anzeichen dafür, dass es auch zu Kontakt der Menschen in Afrika mit den neu entdeckten Henipaviren gekommen ist. So konnten Pernet et al. in humanen Seren aus Kamerun Antikörper finden, die sowohl GH-M74a als auch NiV und HeV neutralisieren konnten (Pernet et al., 2014b). Ein Großteil der Personen, in deren Serumproben Antikörper gefunden wurden, hatten zuvor Kontakt mit Flughund-Schlachtmaterial (*bushmeat*). Auch in Schweinen aus Afrika konnten bereits Antikörper gegen Henipaviren nachgewiesen werden (Hayman et al., 2011). Dies spricht für die Gefahr eines *spillovers* des Virus vom Flughund auf das Schwein oder den Menschen. Bisher wurden zwar noch keine Fälle von Henipavirus-Enzephalitiden in Afrika berichtet, jedoch ist es aufgrund des Mangels an Ärzten, der Verbreitung von Malaria und Gelbfieber zu vermuten, dass es zu Fehldiagnosen und unberichteten Fällen kommt (Pernet et al., 2014b). Somit ist die Charakterisierung neuer afrikanischer Henipaviren von großer Wichtigkeit. Da es bisher nicht gelungen ist, lebende Viren zu isolieren, muss auf die Charakterisierung der Glykoproteine zurückgegriffen werden.

Die von uns und anderen beobachteten funktionellen Unterschiede im Vergleich zum humanpathogenen NiV und die Entdeckung, dass die M74-Glykoproteine nur in vereinzelten Zelllinien Zell-Zell-Fusion verursachen können (Krüger et al., 2013; Weis et al., 2014; Lawrence et al., 2014; Pernet et al., 2014a), muss die zukünftigen

Virusisolationsversuche beeinflussen. Hier sollte man versuchen, genau diese Zelllinien zum Anzüchten der Viren zu verwenden.

Nur durch die sorgfältige Charakterisierung vermehrungsfähiger afrikanischer Henipaviren hinsichtlich Zell-, Gewebs- und Wirtstropismus im Vergleich mit den bereits bekannten Henipaviren HeV, NiV und CedPV wird es letztendlich möglich sein, Aussagen über das humanpathogene Potential dieser neu entdeckten Viren zu treffen.

IV. Material

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| | |
|--|------------------------------------|
| Aceton | Acros, Geel, Belgien |
| Acrylamid (Rotiphorese Gel 30 % Acrylamid) | Roth, Karlsruhe |
| Agarose NA (ultra pure) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Biorad, München |
| Ampicillin (Natrium-Salz) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Bacto-Agar | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Borsäure | Fisher Scientific, Leiceistershire |
| Bromphenolblau (BPB) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Serva, Heidelberg |
| Calciumchlorid (CaCl_2) | Merck, Darmstadt |
| DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]octan) | Merck, Darmstadt |
| DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Desoxycholsäure (DOC) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Didesoxynukleotide (dNTPs) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dithiothreitol (DTT) | Serva, Heidelberg |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Roth, Karlsruhe |
| <i>Enlightning</i> | Dupont, Belgien |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol, abs. (EtOH) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ethidiumbromid (EtBr) | Roche, Mannheim |
| Fötales Kälberserum (FCS) | Gibco BRL, Eggentsein |
| FuGENE HD Transfection Reagent | Promega, Madison, USA |
| Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau) | Merck, Darmstadt |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |

| | |
|---|--------------------------------|
| Hefeextrakt | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) | Merck, Darmstadt |
| Kulturgefäße/-schalen | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| L-Glutamin | Gibco BRL, Eggenstein |
| Lipofectamine™2000 Reagent | Invitrogen, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid (MgCl_2) | Merck, Darmstadt |
| Mass Ruler™DNA Ladder, Mix | Thermo Scientific, Schwerte |
| <i>Medical X-Ray screen film blue sensitive</i> | Raymed Imaging, Krauchthal |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Milchpulver | Saliter, Obergünzburg |
| Mowiol 4-88 | Calbiochem, San Diego, USA |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumdihydrogenphosphat (Na_2HPO_4) | Merck, Darmstadt |
| NeutrAvidin- Agarose Beads | Thermo Scientific, Schwerte |
| Nitrozellulose-Membran | GE Healthcare, München |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin | Gibco BRL, Eggenstein |
| Pepton aus Casein | Merck, Darmstadt |
| Promix [^{35}S]-Methionin und -Cystein | Amersham, Braunschweig |
| Proteaseinhibitormix | Calbiochem, USA |
| Protein A-Sepharose (Prot. A) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Roth, Karlsruhe |
| Sucrose | Roth, Karlsruhe |
| Sulfo-NHS-Biotin | Calbiochem, USA |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) | Biorad, München |
| Tris (Trishydroxymethylaminomethan) | Acros, Geel, Belgien |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Whatman-Filterpapier | GE Healthcare, München |

4.2 Enzyme

| | |
|--|-------------------------|
| SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Streptavidin-Peroxidase | GE Healthcare, München |
| T4 DNA Ligase | Fermentas, St. Leon-Rot |
| Trypsin-EDTA | Gibco BRL, Eggenstein |
| Velocity DNA-Polymerase | Bioline, Luckenwalde |

Restriktionsendonukleasen

| | |
|---------------------------------|---------------------|
| NheI HF (5'... G_CTAGC ... 3') | NEB, Frankfurt a.M. |
| NotI HF (5'...GC_GGCCGCG ...3') | NEB, Frankfurt a.M. |

Die entsprechenden Puffer wurden von den jeweiligen Firmen bezogen.

4.3 Inhibitoren

| | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Cathepsin L Inhibitor III (CatLIII) | Calbiochem, San Diego, USA |
| E64d | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Monensin | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid) | Merck Eurolab, Darmstadt |
| Sucrose | Roth, Karlsruhe |

4.4 Antikörper

| Primärantikörper: | Spezies | |
|-------------------|-----------|------------------------------|
| anti-flag-tag | Kaninchen | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| anti-flag-tag | Maus | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| anti-HA-tag | Kaninchen | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| anti-HA-tag | Maus | Covance, Princeton, USA |
| anti-GFP | Ziege | Rockland, Gilbertsville, USA |

Sekundärantikörper

| | | |
|-------------------------------------|-----------|------------------------------|
| anti-Maus IgG/Alexa Fluor 488 | Ziege | Invitrogen, Oregon, USA |
| anti-Maus IgG/Alexa Fluor 568 | Ziege | Invitrogen, Oregon, USA |
| anti-Kaninchen IgG/Alexa Fluor 488 | Ziege | Invitrogen, Oregon, USA |
| anti-Kaninchen IgG/ Alexa Fluor 568 | Ziege | Invitrogen, Oregon, USA |
| anti-Maus IgG/biotinyliert | Schaaf | GE Healthcare, München |
| anti-Maus IgG/IRDye 800 | Esel | Rockland, Gilbertsville, USA |
| anti-Ziege IgG/IRDye 700 | Kaninchen | Rockland, Gilbertsville, USA |

4.5 Kits

| | |
|--|------------------------------|
| Plasmid DNA Mini Kit I | Omega bio-tek, Norcross, USA |
| E.Z.N.A. Plasmid DNA Maxi Kit | Omega bio-tek, Norcross, USA |
| QIAfilter® Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit | Agilent Technologies, USA |

Die Komponenten der Kits und die Zusammensetzung der jeweils enthaltenen Lösungen können den entsprechenden Firmenprotokollen entnommen werden.

4.6 Plasmide

| | |
|----------------------------|---|
| pCAGGS + MCS (leer) | AG Becker, Institut für Virologie, Marburg |
| pCAGGS-NiV-F _{HA} | Eva Haller, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg |
| pTM1 + MCS (leer) | AG Garten, Institut für Virologie, Marburg |
| pCAGGS-eGFP | AG Becker, Institut für Virologie, Marburg |

4.7 cDNAs

GH-M74a-F Jan Felix Drexler, AG Drosten, Bonn

GH-M74a-G Jan Felix Drexler, AG Drosten, Bonn

Die Sequenzen der beiden erhaltenen cDNAs sind im Anhang aufgeführt.

4.8 Primer

Die Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg, hergestellt.

Sequenzierprimer

| Bezeichnung | Sequenz |
|-------------|------------------------------------|
| pCAGGS-For | 5'- CCTTCTTCTTTTTCCTACAG - 3' |
| pCAGGS-Rev | 5'- CCTTTATTAGCCAGAAGTCAGATGC - 3' |
| pTM1-For | 5'- GAACCACGGGGACGTGGTTT - 3' |

Klonierungsprimer

| Bezeichnung | Sequenz |
|---------------------------|--|
| GH-M74a-F NheI for | 5' TCTAGAGCGGCCGCGCAAGCAATATCCCAG GAAACAAC 3' |
| GH-M74a-F NheI kozak for | 5' GCCGAATTCGCCACCATGGTAGTTATACTTG 3' |
| GH-M74a-F HA NotI rev | 5' CTAGCTAGCTCAAGCGTAATCCGGGACGTCG TACGGATAATCTCGATCTCTGTCAAT 3' |
| GH-M74a-F 2xFlag NotI rev | 5' CTAGCTGATTACTTATCGTCATCGTCCTTGTA GTCCTTATCGTCATCGTCCTTGAGTCGTAGTTA TATGTGGAG 3' |
| GH-M74a-F NotI rev | 5' CTAGCTAGCTCAATCTCGATCTCTGTCAATTG ATCGAG 3' |

| | |
|---------------------------|---|
| GH-M74a-G NheI for | 5' GCCGAATTCGCCACCATGGTAGTTATACTTG 3' |
| GH-M74a-G HA NotI rev | 5' CTAGCTGATTAAGCGTAATCCGGGACGTCGT ACGGATAGTAGTTATATGTGGAG 3' |
| GH-M74a-G 2xFlag NotI rev | 5' GCTAGCTGATTACTTATCGTCATCGTCCTTGT AGTCCTTATCGTCATCGTCCTTGTAGTCGTAGT TATAGTGGAG 3' |
| GH-M74a-G NotI rev | 5' GCTAGCTGATTAGTAGTTATATGTGGAGCGC AAGGGAA 3' |

Mutageneseprimer

| | |
|--------------------------|--|
| NiV-F2/GH-M74a-F1 rev | 5' TAATGCCACTCCTGCAATTATAACGCCAGCAA ATCTCACATCACCGACAAGGTCAT 3' |
| GH-M74a-F1/NiV-F2 for | 5' ACAACACTCATGACCTTGTCGGTGATGTGAG ATTTGCTGGCGTTATAATTGC 3' |
| GH-M74a-F2/NiV-F1 rev | 5' CCATTATAACTCCGGCTAAACGTGCATTCCCA GGGGCTG 3' |
| NiV-F1/GH-M74a-F2 for | 5' CCCTGGGAATGCACGTTTAGCCGGAGTTATA ATGGC 3' |
| GH-M74a-F Δ1-90/I91M for | 5' CGGGGCGGCCGCGCAAGCAATATCCCAGG AAACAACCCTGGTACAGCACAATGAAAAGAGG GAAGAGAAGAAATGG 3' |
| GH-M74a-F Δ1-97 (+A) for | 5' TCTAGAGCGGCCGCGCAAGCAATATCCCAG GAAACAACCCTGGTACAGCACAATGGTCATAAA TGGGAACATTATAAC 3' |

QuikChange Mutagenese Primer

| | |
|---------------------|---------------------------------|
| GH-M74a-F M119T for | 5' TGAAGACACAGACGAGTGAAGGTGC 3' |
| GH-M74a-F M119T rev | 5' GCACCTTCSTCGTCTGTGTCTTCA 3' |

| | |
|--------------------|--|
| GH-M74a-F M1T for | 5' CTGGTACAGCACAAACGAAGAAAAAGACGG 3' |
| GH-M74a-F M1T rev | 5' CCGTCTTTTTCTTCGTTGTGCTGTACCAG 3' |
| GH-M74-F I91M for | 5' GATAAATCTTACAAGCATATGAAAAGAGGGAA GAGAAGAAATGG 3' |
| GH-M74-F I91M rev | 5' CCATTTCTTCTCTTCCCTCTTTTCATATGCTTG TAAGATTTATC 3' |
| GH-M74a-F (+A) for | 5' GGAAGAGAAGAAATGGTCATAAATGGGAAC ATTATAAC 3' |
| GH-M74a-F (+A) rev | 5' GTTATAATGTTCCCATTATGACCATTCTTCT CTTCCC 3' |

4.9 Zellkulturmedien

| | |
|--|--------------------------|
| <i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i> (DMEM) | Gibco BRL, Eggenstein |
| <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Medium ohne Methionin und Cystein) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| <i>Minimal Essential Medium</i> (MEM) | Gibco BRL, Eggenstein |
| OptiMEM | Gibco BRL, Eggenstein |

4.10 Zelllinien

| | |
|--|--|
| MDCK II (<i>Madin–Darby canine kidney</i>) | Nierenepithelzelllinie eines Cockerspaniels (<i>Canis familiaris</i>) |
| Vero76 | Nierenepithelzelllinie einer afrikanischen Grünen Meerkatze (<i>Ceropithecus aethiops</i>) |
| Hela | Humane Zervixkarzinomzelllinie |
| A549 | Humane Alveolar- adenokarzinomzelllinie |

| | |
|------------|--|
| BHK-T7 | Epithelzelllinie aus der Niere eines Hamsters, die stabil die T7-Polymerase exprimiert |
| 293T | Humane embryonale Nierenepithelzelllinie |
| EidNi/41.3 | Nierenzelllinie eines afrikanischen Flughundes der Gattung <i>Eidolon helvum</i> |
| HypNi/1.1 | Nierenzelllinie einer Fledermaus der Gattung <i>Hypsignathus monstrosus</i> |
| PAEC-EB2 | Endothelzelllinie aus der Aorta des Schweins, welche stabil EphrinB2 exprimiert |

4.11 Medien für Bakterien

LB-Medium

10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 l dH₂O
autoklavieren

LB-Agar

1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium

4.12 Bakterien

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue

Stratagene, Heidelberg

4.13 Puffer

BPB-Probenpuffer (6x) für Agarosegele

0,25 % Bromphenolblau (BPB)
40 % Sucrose
in dH₂O

PBS_{def} (*phosphate buffered saline deficient*)

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g Na₂HPO₄
0,2 g KH₂PO₄
ad 1 l dH₂O

PBS++

0,1 g MgCl₂
0,13 g CaCl₂
ad 1 l PBS_{def}

TBE-Puffer (10x)

121,2 g Tris
51,4 g Borsäure
3,7 g EDTA
ad 1 l dH₂O

Tfb-Puffer 1

30 mM Calciumacetat
50 mM MnCl₂

100 mM KCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin
steril filtrieren

Tfb-Puffer 2

10 mM Na-Mops (pH 7)
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15 % Glycerin
steril filtrieren

2x SDS-Probenpuffer für SDS-PAGE

1,0 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
2,0 ml 10 % SDS
1,0 ml Glycerin
0,1 ml Bromphenolblau
0,4 ml dH₂O

10x Laufpuffer für SDS-Gele

10 g Na-Mops (pH 7)
30 g Tris
144 g Glycin
ad 1 l dH₂O

Transferpuffer

5,8 g Tris
2,9 g Glycin

200 ml Ethanol
ad 1 l dH₂O

RIPA-Puffer

(*radioimmunoprecipitation assay buffer*)

1 % Triton X-100
1 % DOC
0,1 % SDS
0,15 M NaCl
20 mM Tris/HCl, pH 7,5
10 mM EDTA
ad 100 ml dH₂O

4.14 Mowiol

Mowiol wird zum Eindeckeln der Präparate der Immunfluoreszenz benutzt.

2,4 g Mowiol 4-88
6 g Glycerin
6 ml dH₂O
über Nacht quellen lassen
2 ml 0,2 M Tris pH 8,5

Der Ansatz löst sich bei 50-60 °C unter ständigem Rühren. Anschließend wird er für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit DABCO (10 % w/v) versetzt. Das Mowiol wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

V. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Tfb- und Hitzeschocktransformation

Als Transformation wird die Aufnahme frei vorliegender DNA durch prokaryotische Zellen bezeichnet. Zellen, die in der Lage sind frei vorliegende DNA aufzunehmen, werden als kompetente Zellen bezeichnet. Nur sehr wenige Zellen sind von Natur aus kompetent, doch ist es möglich einige Bakterienstämme, wie auch den in dieser Arbeit verwendeten *E.coli*-Stamm XL1-Blue durch Behandlung mit Chemikalien zur Aufnahme von DNA zu befähigen (Chung et al., 1989). Durch einen zusätzlichen Hitzeschock der chemisch kompetenten Bakterien lässt sich die Effizienz der Transformation weiter erhöhen. Zur anschließenden Selektion transformierter Bakterien tragen diese eine Plasmid-kodierte Antibiotikaresistenz. 5 ml LB-Medium wurden mit dem *E. coli*-Stamm angeimpft und auf einem Schüttler über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,6 bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien für 10 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Das Bakterienpellet wurde in 40 ml Tfb-Puffer 1 (*transformation buffer 1*) gelöst und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm und 4 °C für 8 min wurde das Bakterienpellet in 4 ml Tfb-Puffer 2 resuspendiert und in Aliquots à 100 µl bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für eine Transformation wurden diese *E.coli* auf Eis aufgetaut, 1 µg Plasmid-DNA zu den 100 µl Bakteriensuspension gegeben und für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec im Heizblock und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Da die Bakterien eine plasmidkodierte Ampicillin-Resistenz besaßen, wurden sie auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Nach Ausplattieren der Bakterien erfolgte eine Inkubation über Nacht

bei 37 °C. Resistente Kolonien wurden in LB-Medium mit Zusatz von Ampicillin überführt, bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD von 0,6 kultiviert und die Plasmid-DNA nach der Standardmethode isoliert (5.1.2).

5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das E.Z.N.A Fast Filter Plasmid DNA Maxi Kit (Maxiprep, für 100 ml Übernachtskultur) oder das Plasmid DNA Mini Kit (Miniprep, für 5 ml Übernachtskultur) von Omega bio-tek verwendet. Die Durchführung der Präparation erfolgte nach den Angaben der jeweiligen Kit-Hersteller.

Grundprinzip der Kits ist die alkalische Lyse der Bakterien. Nach der Zelllyse erfolgt eine Neutralisation und eine Fällung der Proteine sowie der chromosomalen DNA durch Zentrifugationsschritte bei der Miniprep-Methode oder Filtration bei der Maxiprep-Methode. Die Plasmid-DNA bindet unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran. Die gebundene DNA wird nach einem Waschschrift mit dH₂O eluiert. Die Waschschriffe vermindern die Verunreinigung durch bakterielle Rückstände, wie Pyrogene, die bei einem späteren Einsatz der Plasmide wie Transfektionen (5.2.4 und 5.2.5) stören könnten.

5.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die DNA-Konzentration in einer wässrigen Lösung durch den linearen Zusammenhang zwischen der Absorption einer Lösung und der Konzentration des darin gelösten Stoffes bestimmt werden. Zur

Messung wurde die DNA in dH₂O bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) mit einem Photometer (NanoDrop) gemessen.

5.1.4 Präparativer Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die innerhalb der Bakterienzelle die Aufgabe der Zerstörung von Fremd-DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung übernehmen. Sie erkennen meist kurze, palindromische DNA-Sequenzen und spalten die DNA innerhalb oder nahe dieser Sequenzen. Durch die Spaltung können an den DNA-Strängen zwei Arten von Enden entstehen, zum einen überhängende Enden (*sticky ends*) oder zum anderen nicht überhängende Enden (*blunt ends*). Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann somit doppelsträngige DNA in Fragmente definierter Länge geschnitten werden, die nach Auftrennung im Agarosegel ein charakteristisches Bandenmuster ergeben. Ein präparativer Restriktionsverdau wird normalerweise dafür eingesetzt, ein spezifisches Gen-Fragment (*Insert*) aus einem Expressionsvektor (Ausgangsplasmid) herauszuschneiden und in einen anderen Expressionsvektor (Zielpasmid) einzuklonieren. In dieser Arbeit wurde er jedoch auch anders eingesetzt. Das *Insert* wurde zum Teil durch PCR (siehe 5.1.8) direkt aus dem Ausgangsplasmid repliziert und mutiert und dann nach einer Gelextraktion (siehe 5.1.6) mittels eines präparativen Restriktionsverdaus an den Enden geschnitten, um es in das Zielpasmid einklonieren zu können. Das Zielpasmid entsprach hierbei dem leeren Ausgangsplasmid. Dieses wurde in einem getrennten Verdau ebenfalls mit denselben Restriktionsenzymen linearisiert.

Für einen präparativen Restriktionsverdau des *Inserts* wurde folgender Ansatz genutzt:

| | |
|----------------------------|------------------------------------|
| 50 µl | Insert-DNA (aus der Gelextraktion) |
| 3 µl | Puffer |
| 0,3 µl | BSA |
| 10 U | Restriktionsenzym 1 |
| 10 U | Restriktionsenzym 2 |
| ad 60 µl dH ₂ O | |

Zur Linearisierung des Zielplasmids wurde der folgende Ansatz gewählt:

| | |
|----------------------------|---------------------|
| 5 µg | Plasmid-DNA |
| 3 µl | Puffer |
| 0,3 µl | BSA |
| 10 U | Restriktionsenzym 1 |
| 10 U | Restriktionsenzym 2 |
| ad 30 µl dH ₂ O | |

Die Ansätze wurden über Nacht bei der optimalen Reaktionstemperatur des Enzymgemisches inkubiert.

Anschließend wurde die verdaut DNA in 6x Probenpuffer aufgenommen und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (5.1.5).

5.1.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Durch die Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente in einem Spannungsfeld ihrer Größe nach auftrennen. Zusätzlich zu den DNA-Proben wird noch ein Größenmarker aufgetragen, welcher es durch sein bekanntes Bandenmuster ermöglicht, die ungefähre Laufhöhe und somit die Größe der Fragmente abzulesen. Agarose ist ein Polysaccharid aus Galaktose, welches aus der Rotalge *Gelidium* gewonnen wird und nach Erwärmung in TBE-Puffer und Abkühlung Quervernetzungen ausbildet. Diese Quervernetzungen werden von kleineren DNA-Fragmenten schneller durchlaufen als von größeren und ermöglichen so eine Auftrennung nach Größe. Phosphatgruppen an der Außenseite der DNA-Moleküle sind der Grund für ihre negative Ladung, wodurch sie in einem Spannungsfeld von der Kathode (- Pol) zur Anode (+ Pol) wandern.

Um die DNA-Fragmente auf dem Gel detektieren zu können, wird der Agarose Ethidiumbromid (C₂₁H₂₀N₃Br) zugesetzt, ein Farbstoff, der zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA interkaliert und im sichtbaren Bereich fluoresziert, wenn er

durch UV-Licht ($\lambda = 250$ bis 350 nm) angeregt wird.

Die Agarose wurde 1 % ig in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgekocht, bis sie vollständig aufgelöst war. Nach Abkühlen auf Handwärme wurde Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von $0,3 \mu\text{g/ml}$ zugegeben und die verflüssigte Agarose in einen Gelschlitten gegossen, in den ein Gelkamm für die Probenaschen eingesetzt war. Nach dem Erstarren des Gels wurde es mit dem Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5-fachem TBE-Puffer überschichtet. Dann wurde vorsichtig der Kamm entfernt, die mit 6x Probenpuffer versetzten Proben sowie der Größenmarker in die Taschen pipettiert und eine Elektrophorese bei 120-150 V für 30-90 min durchgeführt. Zur Dokumentation wurden die Gele in einer Apparatur (GelDoc, Bio-Rad) unter UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) fotografiert. Handelte es sich um ein präparatives Agarosegel eines Restriktionsverdau, so wurden die DNA-Fragmente zuvor unter langwelligem UV-Licht ($\lambda = 366$ nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten.

5.1.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung der DNA aus den ausgeschnittenen Gelstücken eines präparativen Restriktionsverdau wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Das Gelstück wurde, ausgehend von seinem Gewicht, in der 3-fachen Menge Puffer bei 50°C gelöst, die DNA im Anschluss unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran gebunden, mehrmals gewaschen und mit dH_2O eluiert.

5.1.7 Ligation

Mit Hilfe der Ligation können das durch Gelextraktion (siehe 5.1.6) und präparativen Restriktionsverdau (siehe 5.1.4) erhaltene Insert und das linearisierte Zielplasmid miteinander verbunden werden. Hierzu werden DNA-Ligasen verwendet, die freie 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatreste unter ATP-Verbrauch durch eine

Phosphodiesterbindung kovalent miteinander verknüpfen. Um in der folgenden Ligungsreaktion einer Rezirkularisierung des Vektors vorzubeugen, wurden die 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA durch eine alkalische Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SAP) entfernt. Diese Dephosphorylierung wurde wie folgend angesetzt:

| | |
|-------|-----------------------------|
| 50 µl | Eluat Vektor |
| 10 µl | 10x SAP-Puffer |
| 10 U | SAP |
| | ad 100 µl dH ₂ O |

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert.

Zum Abschätzen der DNA-Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA wurde ein Agarosegel genutzt und anhand der Banden des Größenmarkers und ihrer definierten Menge die Konzentrationen geschätzt und die molare Menge bestimmt. Für eine optimale Effizienz der Ligation wurde ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 gewählt und mit 2 µl T4-Ligase, 2 µl 10x T4-Puffer über Nacht bei 16 °C inkubiert. Nach der Ligation wurden die Ansätze mittels Hitzeschocktransformation (5.1.1) in *E.coli* des Stammes XL1-Blue eingebracht. Die Plasmid-DNA wurde nach Anzucht der gewachsenen Kolonien aus den Bakterien präpariert (5.1.2) und sequenziert.

5.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, mit der man einen bestimmten, durch einen *forward*- und einen *reverse*-Primer flankierten DNA-Abschnitt vervielfältigen kann. Primer sind Oligonukleotide, die sich an einzelsträngige DNA anlagern und somit Polymerasen als Startpunkt für die DNA-Synthese dienen. Zusätzlich zur Ausgangs-DNA (*template*) und den beiden Primern enthält ein PCR-Ansatz eine hitzestabile DNA-Polymerase und Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) aus denen die Polymerase den komplementären Strang bildet. Die Reaktion durchläuft mehrere Zyklen der Replikation, die jeweils aus drei Phasen bestehen. In der ersten Phase jedes Zyklus werden die DNA-Doppelstränge bei einer hohen

Temperatur von 97 °C aufgetrennt. In der zweiten Phase, *Annealing* genannt, wird bei deutlich niedrigerer Temperatur von ca. 60 °C das Binden der Primer an das einzelsträngige *template* ermöglicht. Die Temperatur ist noch hoch genug, um eine Rückbildung der DNA-Doppelstränge zu verhindern. In der dritten Phase, der Elongation, wird ausgehend von den gebundenen Primern die DNA von der Polymerase zum Doppelstrang ergänzt. Je nach verwendeter Polymerase und deren Temperaturoptimum liegt die Temperatur der Elongation bei 68-72 °C.

In dieser Arbeit wurde die Polymerase-Kettenreaktion dafür genutzt N- und C-terminale Restriktionsenzymschnittstellen und HA- bzw. Flag-tags den Proteinen anzufügen sowie zur Mutation und Deletion N- und C-terminaler Regionen. Dazu wurden für jede Reaktion spezifische *forward*- und *reverse*-Primer erstellt und eingesetzt.

Die PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammengestellt:

| | |
|----------------|------------------------------------|
| 1 µl (100 ng) | Ausgangs-DNA (cDNA / pCAGGS M74-F) |
| 2 µl (20 pmol) | <i>forward</i> -Primer |
| 2 µl (20 pmol) | <i>reverse</i> -Primer |
| 1 µl (100 nM) | dNTP-Mix |
| 10 µl | 5x HiFi-Puffer |
| 0,5µl (1 U) | Velocity DNA-Polymerase |
| | ad 50 µl dH ₂ O |

Zyklusparameter:

| | | | |
|----------|--------|---------------------------------|-------------|
| 97 °C | 2 min | Denaturierung vor dem 1. Zyklus | |
| 97 °C | 30 sek | Denaturierung | } 25 Zyklen |
| 60-70 °C | 1 min | Annealing | |
| 72 °C | 2 min | Elongation | |
| 72 °C | | 5 min | |
| 8 °C | | forever | |

Alle Reaktionen wurden in einem programmierbaren Heizblock durchgeführt.

Eine weitere PCR Methode ist die *Overlapping-PCR* zum fusionieren zweier Proteine. Hierfür wurden die einzelnen Proteinuntereinheiten mittels PCR und speziellen Primern aus dem Ausgangsplasmid amplifiziert. In dieser Arbeit wurde der M74-F₂-Untereinheit am C-Terminus eine zum N-Terminus der NiV-F₁-Untereinheit homologe Sequenz angehängt. Der NiV-F₁-Untereinheit wurde hingegen eine zum C-Terminus der M74-F₂-Untereinheit homologe Sequenz an den N-Terminus angehängt. Diese überlappende Sequenz bildete in einer darauffolgenden PCR einen kurzen Doppelstrang aus, welcher der Polymerase als Primer diente und diese somit einen kompletten Doppelstrang synthetisierte. Nach dieser PCR Reaktion wurden dem Ansatz der *forward* Primer GH-M74a-F NotI for und der *reverse* Primer NiV-F_{HA} NheI rev zugefügt und eine weitere PCR zur Vervielfältigung der DNA Sequenz durchgeführt.

Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit dem Qiagen PCR-Purification Kit gemäß des Herstellerprotokolls aufgereinigt und ein präparativer Restriktionsverdau der Plasmid-DNA (5.1.4) durchgeführt.

5.1.9 Quick Change Mutagenese

Die Quick Change Mutagenese ist eine Methode zum Einfügen kleiner Mutationen in Plasmid-DNA. Sollten in dieser Arbeit Mutationen nicht direkt N- oder C-terminal eingefügt werden, wurde dies mittels Quick Change Mutagenese erreicht. Hierfür musste zuerst das M74-F-Gen in den pTM1-Expressionsvektor umklontiert werden, da eine Quick Change Mutagenese in pCAGGS-Vektoren erfahrungsgemäß schwierig ist. zulässt. Die Mutationsprimer tragen die Mutation in ihrer Mitte umringt von Sequenzen, die an das Ausgangsplasmid binden. Die *forward*- und *reverse*-Primer sind komplementär und gleich lang. Die Ausgangs-DNA wird mit den Primern, dNTPs und der PfuUltra HF Polymerase gemischt und eine PCR (5.1.8) durchgeführt.

Die Quick Change PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammengestellt:

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| 1 μ l (10 ng) | Ausgangs-DNA (pTM1-M74-F) |
| 1,5 μ l (10 pmol) | <i>forward</i> -Primer |
| 1,5 μ l (10 pmol) | <i>reverse</i> -Primer |
| 1 μ l (100 nM) | dNTP-Mix |
| 5 μ l | 10x Puffer |
| 3 μ l | Quick Solution |
| 1 μ l (1 U) | PfuUltra HF |
| | ad 50 μ l dH ₂ O |

Zyklusparameter:

| | | | |
|-------|--------|---------------------------------|-------------|
| 95 °C | 1 min | Denaturierung vor dem 1. Zyklus | |
| 95 °C | 50 sek | Denaturierung | } 18 Zyklen |
| 60 °C | 50 sek | Annealing | |
| 68 °C | 8 min | Elongation | |
| 68 °C | 5 min | | |

Durch die PCR entstehen DNA-Doppelstränge, welche auf dem neu synthetisierten Strang die Mutation tragen. Auf die PCR folgt ein Verdau mit DpnI, welches die methylierte (und unmutierte) Ausgangs-DNA verdaut, wodurch nur noch mutierte DNA-Einzelstränge im Ansatz vorhanden sind. Dieser Ansatz wird in ultrakompetente *E.coli* transformiert (5.1.1) und für 1 h in flüssigem LB-Agar ohne Antibiotikum bei 37 °C schüttelnd inkubiert bevor sie auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert werden. Nach 24 h bei 37 °C werden die gewachsenen Klone gepickt, eine Mini-Kultur angeimpft, geprüft (5.1.2) und die DNA sequenziert.

Nach erfolgreicher Mutation wurde das M74-F-Protein wieder aus dem pTM1-Vektor in den pCAGGS-Vektor umklontiert.

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Passagieren von Zellen

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl verschiedener Säugerzelllinien verwendet, hauptsächlich jedoch Vero-Zellen, Nierenepithelzellen aus der afrikanischen Grünen Meerkatze, sowie *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK)-Zellen, eine Epithelzelllinie aus der Niere eines Cockerspaniel. Bei allen eingesetzten Zelllinien handelt es sich um permanente Zelllinien mit adhärentem Wachstum. Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert bis sie wiederum einen konfluenten Monolayer ausgebildet hatten. Zur Kultivierung wurden geeignete Zellkulturgefäße aus Kunststoff (Firma Greiner) verwendet. Als Zellkulturmedium wurde für die MDCK-Zellen *Minimal essential medium* (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) verwendet, für die Vero-Zellen und alle anderen Zelllinien wurde *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) mit ebenfalls 10 % FCS genutzt. Zu beiden Medien wurde jeweils noch die Aminosäure L-Glutamin sowie 100 Units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugefügt, um mögliche Kontamination durch Bakterien und Pilze zu verhindern. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Lamina Flow (Heraeus) durchgeführt. Um den konfluent gewachsenen Zellrasen vom Boden des Zellkulturgefäßes zu lösen, wurde das alte Medium abgegossen und der Zellrasen zweimal mit PBS_{def} gewaschen. Daraufhin wurde auf eine 250 ml Zellkulturflasche 3 ml Trypsin/EDTA gegeben und im Brutschrank bei 37 °C so lange inkubiert, bis sich der Zellrasen vollständig vom Flaschenboden abgelöst hatte. Jetzt konnten die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung auf eine neue Flasche passagiert. Für eine 1:10 Passage wurde 1 ml Zellsuspension in eine neue Flasche gleicher Größe mit 20 ml Kulturmedium gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zum Heranwachsen eines konfluenten Zellrasens inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut passagiert.

5.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren wurde der konfluent gewachsene Zellrasen einer 250 ml Zellkulturflasche wie in 5.2.1 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die in Medium aufgenommenen Zellen wurden in einem Zellkulturröhrchen (12 ml) bei 500 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Kulturmedium mit 10 % FCS und 10 % Glycerin resuspendiert. Diese Suspension wurde in Einfrierröhrchen pipettiert und in einer Einfrierbox mit Isopropanol über Nacht bei -80 °C langsam eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen in einen Stickstofftank für langfristige Aufbewahrung umgelagert.

Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen wurden diese bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und mit vorgewärmtem Zellkulturmedium in eine Zellkulturflasche überführt. Danach erfolgte eine Inkubation unter normalen Passagebedingungen.

5.2.3 Aussäen von Zellen auf 24- und 6-well-Vertiefungen

Nach Ablösen der Zellen einer konfluent bewachsenen 250 ml Zellkulturflasche und der Vereinzelung der Zellen durch Resuspension (5.2.1) wurden 1/400 bis 1/200 der Zellsuspension in eine 24-well-Vertiefung (optional mit einem Deckglas) oder 1/80 bis 1/40 der Zellsuspension pro 6-well-Vertiefung ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zuvor wurde das Kulturmedium in die Vertiefungen vorgelegt, 500 µl in eine 24-well-Vertiefung, 3 ml in eine 6-well-Vertiefung.

5.2.4 Transfektion mittels Lipofectamin™ 2000

Unter Transfektion versteht man die Aufnahme freier DNA durch eukaryotische Zellen. Um in MCDK-, HypNi/1.1- und Vero-Zellen Fremdgene zeitweilig (transient) zu exprimieren, wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung des Transfektionsagens Lipofectamin™ 2000 (LFA2000) in die Zellen eingeschleust. Bei diesem als Lipofektion bezeichneten Vorgang komplexieren polykationische Lipide mit der Plasmid-DNA und ermöglichen somit der DNA die Zellmembran zu überwinden und

in das Zytoplasma bzw. den Zellkern vorzudringen.

Wichtige Kriterien für eine erfolgreiche Transfektion mit hoher Transfektionsrate sind die Zelldichte (laut Herstellerangaben 70-80 %) sowie das optimale Verhältnis von Transfektionsreagens zu DNA in serumfreien Medium (OptiMEM).

Für die Transfektion eines Deckglases bzw. eines 24-wells wurden 1,5 µl LFA mit 50 µl OptiMEM vermischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Unterdessen wurde 1 µg der Plasmid-DNA in 50 µl OptiMEM aufgenommen und nach der Inkubationszeit mit dem LFA-Ansatz gemischt. Für einen Ansatz in einer 6-well-Vertiefung wurden 7,5 µl LFA bzw. 5 µg Plasmid-DNA mit 250 µl OptiMEM gemischt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde der jeweilige Transfektionsansatz vorsichtig zu den Zellen gegeben, bei denen zuvor das Zellkulturmedium gegen antibiotikafreies Medium ersetzt wurde. Etwa 6 bis 8 h nach Transfektion (*posttransfection*; p.t.) wurde das Transfektionsmedium gegen antibiotikahaltiges Zellkulturmedium getauscht.

5.2.5 Transfektion mittels FuGENE HD

Eine weitere, für die Zellen weniger toxische Transfektionsmethode ist die Transfektion mit dem Transfektionsreagens FuGENE HD. Sie beruht auch auf dem Prinzip kationischer DNA-Lipidkomplexe, welche von den Zellen aufgenommen werden. Auch hier wurden 70-80 % konfluente Zellkulturen transfiziert. Für die Transfektion eines 24-wells wurden 1 µg Plasmid DNA in 20 µl OptiMEM mit 6 µl FuGENE HD gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Zur Transfektion eines 6-wells wurden 5 µg Plasmid DNA in 100 µl OptiMEM mit 30 µl FuGENE HD gemischt. In der Inkubationszeit wurde das Medium auf den zu transfizierenden Zellen gewechselt und danach der Transfektionsansatz dazu getropft. Ein Mediumwechsel ist bei Transfektion mit FuGENE HD nicht erforderlich.

5.3 Biochemische und immunologische Methoden

5.3.1 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die indirekte Immunfluoreszenz wird zum Nachweis von Proteinen auf der Zelloberfläche oder, nach Permeabilisierung, im Zellinneren angewendet. Hierfür wird zunächst ein Erstantikörper, der spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet, auf die Zellen gegeben, wodurch es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper-Komplexen kommt. In einem weiteren Schritt wird ein Zweitantikörper zugegeben, der gegen den Fc-Teil des Erstantikörpers gerichtet ist und an einen Fluoreszenzfarbstoff wie Rhodamin, FITC oder AlexaFluor-Analoga gekoppelt ist. Somit lässt sich durch Anregung mit Emissionslicht der passenden Wellenlänge das markierte Protein mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar machen. Zur indirekten Immunfluoreszenzanalyse wurden auf Deckgläsern ausgesäte Zellen in einer 24-well-Platte 3-mal mit PBS++ gewaschen. Wurden die Proteine im Zellinneren angefärbt, mussten die Zellen zuerst permeabilisiert werden, bei einer Färbung des G-Proteins an der Zelloberfläche entfiel dieser Schritt und es konnte direkt der Erstantikörper in PBS++ mit 0,35 % BSA verdünnt und in einem Volumen von 250 µl pro Deckglas eingesetzt werden. Für diesen Zweck wurde die Erstantikörperverdünnung auf das Deckglas im 24-well pipettiert. Nach Inkubation für 1 h bei 4 °C wurde das Deckglas in der 24-well-Platte 3-malig mit PBS++ gewaschen und die Zellen fixiert. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolge je nach Färbung mit Methanol/Aceton (Met/Ac) 1:1 oder 2 % Paraformaldehyd (PFA)/Triton X-100. Zur Met/Ac-Fixierung wurde eiskaltes Met/Ac auf die Zellen gegeben und diese für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte erneut 3-maliges Waschen mit PBS++. Zur PFA Fixierung wurde 2 % PFA auf die Zellen gegeben und diese für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS++ erfolgte eine 5-minütige Absättigung mit 0,1 M Glycin in PBS++, worauf wieder 3-maliges Waschen mit PBS++ folgte. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen für 10 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS_{def} bei RT inkubiert. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in PBS++ mit 0,35 % BSA verdünnt und in einem Volumen von 250 µl pro Deckglas für 45 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zum Nachweis der Zellkerne wurde zur Zweitantikörperlösung

DAPI (1 µg/µl in PBS++) im Verhältnis 1:10000 zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit PBS++ gewaschen, in dH₂O getaucht und mit Mowiol eingedeckelt. Hierfür wurden 7 µl Mowiol auf einen Objektträger pipettiert und das Deckglas luftblasenfrei mit der Zellseite nach unten aufgelegt und angedrückt. Überschüssiges Mowiol wurde vorsichtig abgesaugt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Betrachtet und ausgewertet wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M-Mikroskop) oder konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica SP5).

5.3.2 Biotinylierung von Membranproteinen auf der Zelloberfläche

Membranproteine auf der Zelloberfläche lassen sich mit Sulfo-NHS-Biotin markieren (Lisanti et al., 1988). In der Natur hat Biotin eine sehr hohe Affinität zu Avidin/Streptavidin. Das in dieser Arbeit verwendete Sulfo-NHS-Biotin bindet unter Freisetzung des NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid)-Esters an primäre Amine, d. h. an den Aminoterminus und die Seitenketten von Lysinresten in Proteinen. Sulfo-NHS-Biotin ist wasserlöslich und nicht membrangängig. Über Zugabe von Peroxidase-markiertem Streptavidin können die Protein-Biotin-Komplexe nachgewiesen werden. Alle Schritte der Biotinylierung wurden auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Dies soll eine Endozytose der Oberflächenproteine und/oder des Biotins verhindern.

24 h nach Transfektion wurden die in 6-well-Platten zu einem konfluenten Monolayer herangewachsenen Zellen 5-mal mit PBS++ gewaschen und anschließend 2-malig mit je 1 ml frisch angesetzter S-NHS-Biotin Lösung (2 mg/ml PBS++) für 15 min auf Eis inkubiert. Nach dieser Markierung wurden die Zellen 5 min mit 0,1 M Glycin/PBS++ inkubiert und erneut 5-mal mit PBS++ gewaschen, um freies Biotin zu inaktivieren und entfernen. Im Anschluss folgte eine Lyse der Zellen mit 0,5 ml RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitormix (1:100) für 30 min auf Eis. Eine folgende Zentrifugation für 45 min bei 13000 rpm und 4 °C diente zur Entfernung von unlöslichem Zellmaterial. Mit dem Überstand wurde anschließend eine Immunpräzipitation (5.3.3) durchgeführt. Alternativ wurden die Oberflächenproteine einmalig mit 1,2 mg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin pro 6-well für 30 min markiert und

dann mit NeutrAvidin-Beads immunpräzipitiert.

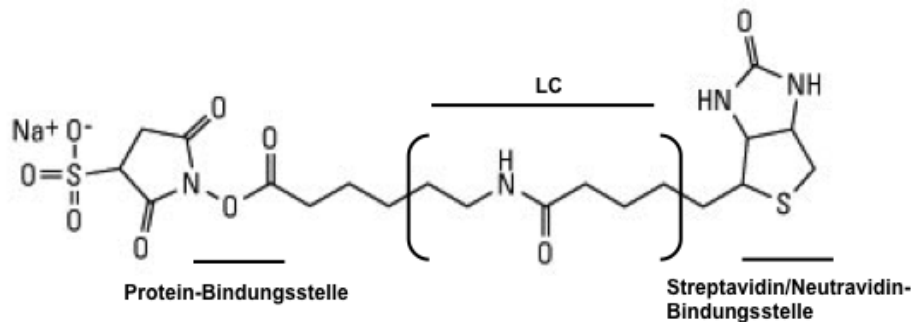


Abb. 5.1: Struktur von Sulfo-NHS- bzw. Sulfo-NHS-LC-Biotin mit wichtigen Moleküldomänen.

5.3.3 Immunpräzipitation

Diese Methode dient der selektiven Isolierung löslicher Proteine, z. B. aus einem Zelllysat mit Hilfe spezifischer Antikörper. Die Protein-Antikörper-Komplexe werden dabei mit an Sepharose gebundenem Protein A aus der Suspension präzipitiert. Dabei bindet das Protein A, ein Zellwandbestandteil des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, an die konstanten Fc-Teile der Antikörper. Durch die Kopplung an Sepharose-Beads lässt sich der Gesamtkomplex durch Zentrifugation vom Lysat trennen. Zur Präzipitation der GH-M74a Glykoproteine sowie deren Mutanten wurden anti-tag spezifische Antikörper aus Kaninchen im Verhältnis 1:500 - 1:100 zum Zelllysat gegeben und über Nacht auf einem Drehrad bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Protein-Antikörper-Komplexe für 45 min mit 40 µl einer 50 %igen Protein A-Sepharose-Suspension (in RIPA-Puffer) gefällt. Danach wurde 4-mal mit RIPA-Puffer gewaschen, um ungebundene Bestandteile zu entfernen. Hierzu wurden 250 µl RIPA-Puffer zu den Proben gegeben, diese für 1 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sepharosepellet in 20 µl 2x SDS-Probenpuffer mit 4 % β-Mercaptoethanol (ME) aufgenommen und die gefällten Proteine durch Aufkochen für 10 min bei 96 °C von der Protein A-Sepharose gelöst. Nach Zentrifugation der Sepharose wurden die Proteine im Überstand unverzüglich auf ein SDS-Gel aufgetragen und in einer SDS-PAGE (5.3.4) aufgetrennt.

Wurden die Oberflächenproteine mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin markiert, erfolgte

die Immunpräzipitation mit 60 µl einer 50 % NeutrAvidin-Beads-Lösung, die an das Biotin binden und somit alle biotinylierten Proteine fällen. Diese Beads wurden in 2x SDS Probenpuffer mit 0,2 mM DTT resuspendiert und aufgekocht, bevor der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und in einer SDS-Page (5.3.4) aufgetrennt wurde.

5.3.4 SDS-PAGE

Mit Hilfe der Natrium-Dodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer Massenunterschiede auftrennen (Laemmli, 1970). Die Proteine werden dazu mit einem SDS- und Bromphenolblau-haltigen Probenpuffer versetzt. Das anionische Detergens SDS lagert sich an die Aminosäurereste an und zerstört dabei alle nicht kovalenten Bindungen im Protein und somit dessen Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur. Die SDS Anionen verleihen den Proteinen proportional zu ihrer Masse eine negative Ladung. Wird β -ME oder DTT dem 2x Probenpuffer beigelegt, werden Disulfidbrücken zwischen Proteinen oder Proteinuntereinheiten reduziert. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden in dieser Arbeit Sammelgele (3,75 %ig) und Trenngele (10-15 %ig) aus Polyacrylamid eingesetzt. Deren Vernetzungsgrad wird durch die Konzentration und dem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt. Die durch SDS negativ geladenen Proteine trennen sich beim Lauf durch das Gel ihrer Größe nach auf, da kleine Proteine schneller ihren Weg durch die „Maschen“ des Gel-Netzes finden als große. Somit erfolgt im Spannungsfeld eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Masse. Durch die Verwendung eines niedriger konzentrierten Sammelgels wird das gleichzeitige Einlaufen der Proteine ins Trenngel gewährleistet. Radioaktiv markierte Proteine (*Pulse Chase* 3.3.7) lassen sich durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das fixierte und getrocknete Gel sichtbar machen. Sollen die Proteine mit Antikörpern oder Streptavidin nachgewiesen werden, können die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden (*Semi-Dry-Blot* 5.3.5). Ein zusätzlich zu den Proben auf das Gel aufgetragener Größenstandard (Marker) ermöglicht das Abschätzen des Molekulargewichts einzelner Proteine. Vor dem Gießen der Polyacrylamidgele wurde

zunächst die Gelapparatur zusammengebaut. Dafür wurden je eine große und eine kleinere Glasplatte mit Ethanol gereinigt und getrennt durch Abstandshalter (*spacer*) in die Gießvorrichtung eingespannt. Dann wurden die Acrylamid-Lösungen für Trenn- und Sammelgel (folgendes Rezept ausreichend für zwei 12 %ige Gele) angesetzt:

Trenngel:**Sammelgel:**

| | | | |
|---------------------|--------|-----------------------|--------|
| dH ₂ O | 2,4 ml | dH ₂ O | 3,4 ml |
| 1,5 M Tris/HCl pH 8 | 3 ml | 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 | 0,6 ml |
| 30 % Acrylamid | 3,6 ml | 30 % Acrylamid | 0,6 ml |
| TEMED | 20 µl | TEMED | 10 µl |
| 10 % APS | 80 µl | 10 % APS | 40 µl |

Direkt nach der Zugabe von Ammonium-Persulfat (APS) und TEMED, die als Katalysatoren zur Beschleunigung der Polymerisation dienen, wurden 3,4 ml der Trenngellösung zwischen die Glasplatten im Gießständer gegossen und sofort mit dH₂O überschichtet. Hierdurch erhält das Trenngel eine gleichmäßig waagerechte Oberkante. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, das Sammelgel nach Zugabe von APS und TEMED auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit benötigter Anzahl Probenaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine Keutz-Miniprotein-Gelkammer eingesetzt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Nach Entfernen des Kamms wurden die Proben mit einer Hamiltonpipette in die Taschen gefüllt und eine Spannung von 150 V angelegt. Der Lauf der Elektrophorese wurde anhand der Bromphenolblau-Bande sowie des mitgeführten Markers verfolgt und die Elektrophorese nach ausreichender Auftrennung gestoppt.

5.3.5 Proteintransfer auf Nitrozellulose (*Semi-Dry-Blot*)

Die mittels SDS-PAGE (5.3.4) aufgetrennten Proteine können über ein Elektrophoretisches-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode aus dem Gel auf die Nitrozellulose, an die sie irreversibel binden. In dieser Arbeit wurde das *Semi-Dry-Blot*-Verfahren angewandt (Kyhse-Anderson, 1984). Nachdem das SDS-Gel, die Nitrocellulose-Membran und acht Whatman-Filterpapiere in Transferpuffer getränkt wurden, konnten sie wie in folgender Abbildung dargestellt auf die Anoden-Kohleplatte der Blotkammer luftblasenfrei geschichtet werden.

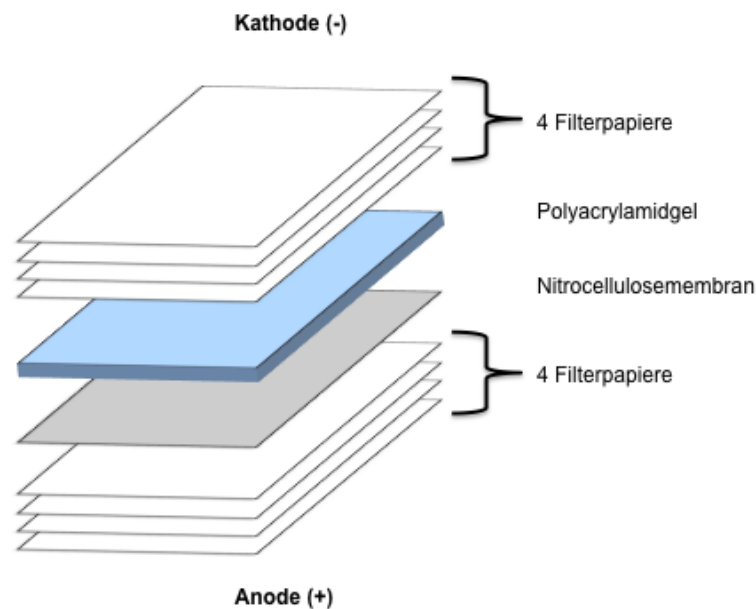


Abb. 5.2: Darstellung der verschiedenen Schichten des Blots.

Darauf kam die Kathoden-Kohleplatte und es wurde für 1,7 h eine Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Nitrozellulose angelegt. Dadurch wurden Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 200 kDa auf die Membran übertragen. Zur Verhinderung unspezifischer Bindung an die Nitrozellulose wurde die Membran nach dem Blotten 1 - 12 h bei 4°C in 5 %iger Milchpulverlösung (in $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit $\text{PBS}_{\text{def}}/0,1\%$ Tween gewaschen und in PBS_{def} bei 4°C gelagert.

5.3.6 Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose

Nach der SDS-Page und dem Elektroblothing erfolgt der Nachweis biotinylierter Proteine mit einer an Streptavidin gekoppelten Peroxidase. Wie bereits unter 5.3.2 erwähnt, geht Streptavidin eine sehr starke, nicht-kovalente Bindung zu Biotin und damit auch zu biotinylierten Proteinen ein. In der sogenannten *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Reaktion oxidiert die Peroxidase das Substrat Luminol unter Lichtabgabe. Die Nitrocellulosemembran wurde mit Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*), die 1:4000 in PBS_{def}/0,1 % Tween verdünnt war, für 45 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS_{def}/0,1 % Tween und einem Waschschriff mit PBS_{def} wurde die Membran 5 min in 1 ml *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* inkubiert. Die Belichtung der Nitrocellulosemembran erfolgte mittels ChemiDoc (Biorad).

Western Blot: Waren die Proteine nicht Biotin gekoppelt, erfolgte der Nachweis mit einem tag spezifischen Erstantikörper aus Maus, der 1:5000 in PBS_{def}/0,1 % Tween verdünnt war, für 1 h bei 4 °C unter Schwenken. Nach dreimaligem Waschen mit PBS_{def}/0,1 % Tween wurde die Nitrocellulosemembran dann entweder mit einem biotinylierten anti-Maus IgG Antikörper für 45 min schwenkend inkubiert und dann weiter verfahren wie mit direkt biotinylierten Proteinen, oder die Membran wurde mit anti-Maus-IRDye800 Antikörpern (1:5000 in PBS_{def}/0,1 % Tween) für 45 min schwenkend inkubiert und nach 3maligem Waschen mit PBS_{def}/0,1 % Tween die Fluoreszenz am Odyssey Gerät gemessen. Zur Quantifizierung der Banden wurde 0,2 µg GFP-Plasmid dem Transfektionsansatz beigefügt und mit einem anti-GFP Erstantikörper aus Ziege (1:10.000) und einem anti-Ziege-IRDye700 Sekundärantikörper (1:5000) mitgefärbt. Die Quantifizierung erfolgte automatisch durch die Odyssey Software (Image Studio Ver 3.1).

5.3.7 Metabolische Markierung von Proteinen (*Pulse Chase*)

Mit Hilfe von ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein ([³⁵S]-Promix) können Proteine während ihrer Synthese in eukaryotischen Zellen radioaktiv markiert werden (*Pulse*). Anschließend werden die Zellen für unterschiedliche Zeiten in nicht radioaktivem Medium inkubiert (*Chase*). Während dieser Zeit können die markierten Proteine

prozessiert, transportiert oder degradiert werden. Nach Zelllyse wird das zu untersuchende Protein aus dem radioaktiven Lysat immunpräzipitiert (5.3.3). Für die metabolische Markierung wurden die Zellen auf 6-well-Platten ausgesät und mit für das NiV-F- oder das M74-F-Protein kodierenden Plasmiden transfiziert. 24 h p.t. wurden die Zellen zunächst nach einmaligem Waschen mit DMEM ohne Cystein (Cys) und Methionin (Met) mit 1 ml dieses Mangelmediums für 45 min bei 37 °C „ausgehungert“. Dann erfolgte die radioaktive Markierung (*Pulse*) durch Inkubation der Zellen für 45 min bei 37 °C mit 500 µl DMEM ohne Cys und Met, dem 10 µl [³⁵S]-Promix zugesetzt waren (entspricht 100 µCi radioaktivem Cystein und Methionin). Im Anschluss wurde das Markierungsmedium entfernt, die Zellen für 0 h bis 12 h mit normalem Zellkulturmedium inkubiert (*Chase*) und dann mit RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitormix 1:100) lysiert. Anschließend wurden die Glykoproteine aus dem Lysat immunpräzipitiert (5.3.3) und das Präzipitat durch SDS-PAGE (5.3.4) aufgetrennt. Das Gel wurde für 30 min in Fixierer (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure) und zur Verstärkung des radioaktiven Signals 30 min in einer Enhancerlösung (Enlightning) inkubiert. Nach Trocknen des Gels wurde für 3 Tage ein Röntgenfilm aufgelegt.

5.3.8 Inhibitionsstudien

Inhibitionsstudien können verwendet werden, um die Spaltung von Proteinen zu untersuchen und sowohl die verantwortliche Protease als auch den Ort der Spaltung und Aktivierung zu identifizieren. Für die Untersuchung des M74-F wurden *Pulse Chase* Analysen (siehe 5.3.7) in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren durchgeführt. Diese Inhibitoren wurden dem Aushunger-, Markierungs- und dem *Chase*-Medium zugesetzt und die *Chase* Dauer betrug 8 h. Darauf wurden die Zellen ebenfalls lysiert, die Glykoproteine aus dem Lysat immunpräzipitiert (5.3.3) und per SDS-PAGE (5.3.4) aufgetrennt. Nach Fixierung und Trocknung des Gels wurde ebenfalls für 3 Tage ein Röntgenfilm aufgelegt (Autoradiographie) und schließlich die Spaltung mittels ImageJ Software quantifiziert.

5.3.9 Qualitativer Fusionsassay

Zellen, die beide NiV-Glykoproteine koexprimieren, können mit ihren Nachbarzellen fusionieren, sofern diese EphrinB2-Rezeptoren tragen. So entstehen durch Fusion lichtmikroskopisch gut sichtbare mehrkernige Riesenzellen (Synzytien). In dieser Arbeit wurde der Fusionsassay zur Funktionalitätskontrolle der GH-M74a Glykoproteine verwendet. Es wurden ca. 70 % konfluente Zellmonolayer in 24- und 6-well-Platten mit GH-M74a-G und GH-M74a-F Wildtyp oder mutierten Genen transfiziert (5.2.4). 24 h p.t. wurden die Zellen 1-mal mit PBS_{def} gewaschen und für 10 min mit 70 %igem Ethanol fixiert. Im Anschluss wurde das Ethanol abgesaugt und 0,5 ml einer 1:10 in dH₂O verdünnten Giemsa-Lösung für 30 min zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen mehrfach mit dH₂O gewaschen und bei RT luftgetrocknet. Die Präparate wurden mit einem Durchlichtmikroskop betrachtet und zur Dokumentation und Auswertung in 100-facher Vergrößerung fotografiert. Alternativ zur Giemsa-Färbung wurde der Fusionsassay auch im 24-well mit Deckglas durchgeführt und die beiden Glykoproteine spezifisch angefärbt (5.3.1).

5.3.10 Overlay Fusionsassay

Beim Overlay Fusionsassay handelt es sich um einen modifizierten qualitativen Fusionsassay (5.3.9). In dieser Arbeit wurde hierfür eine Zelllinie mit den beiden Glykoproteinen transfiziert und 24 h p.t. abgelöst, mit der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und eine definierte Zellzahl auf einen konfluenten Monolayer einer anderen, untransfizierten Zelllinie gegeben. Danach konnte geschaut werden, ob die transfizierten, die Glykoproteine an der Oberfläche tragenden Zellen mit den untransfizierten Zellen fusionieren können. 24 h nachdem die transfizierten Zellen auf die untransfizierten Zellen gegeben wurden, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz (5.3.1) durchgeführt um die Synzytien sichtbar zu machen.

Mit dem Overlay-Fusionsassay sollte geprüft werden, ob die restringierte Fusionsaktivität in Vero-Zellen darauf zurückzuführen ist, dass die Glykoproteine in Vero-Zellen auf eine andere, ineffizientere Art prozessiert werden als in HypNi/1.1-Zellen, oder ob letztere zusätzliche Rezeptoren oder andere Membraneigenschaften besitzen, die eine Fusion unterstützen.

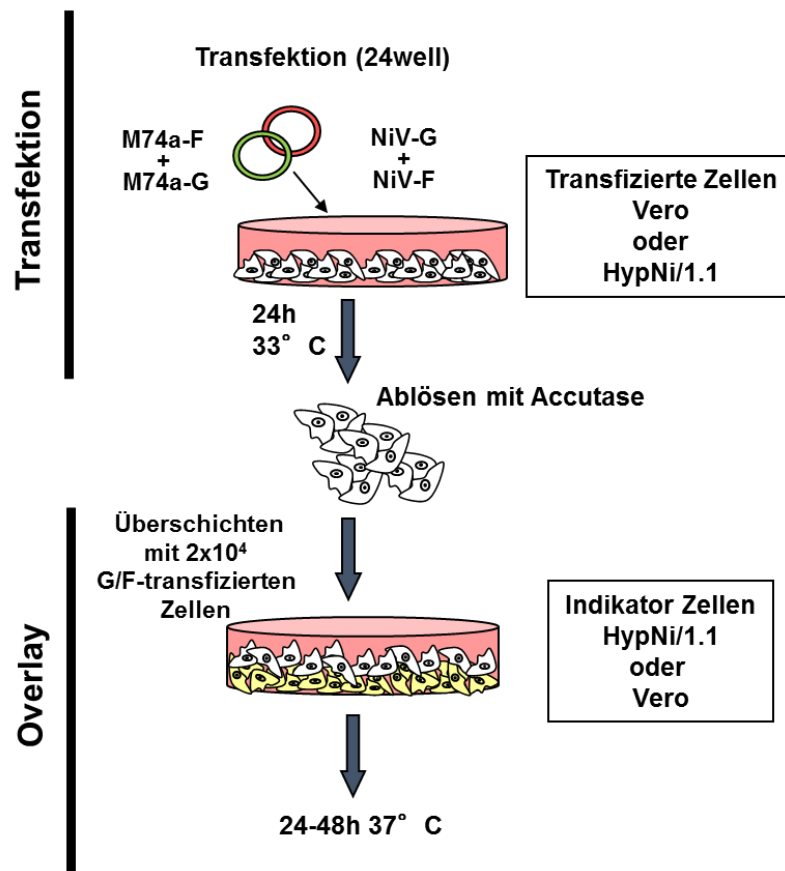


Abb. 5.3: Schema eines Overlay-Fusionsassays.

VI. Literaturverzeichnis

Aziz, J., Olson, J, Lee, OB, Daniels, P, Adzhar, AB, Bunning, M, Sharihuddin Field, H, and Johara Hopper, P: **Nipah virus infection of animals in Malaysia**. Abst. XIth Int. Cong. Virol., Sydney, Australia, 1999, 38.

Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, Soropogui B, Sow MS, Keita S, De Clerck H, Tiffany A, Dominguez G, Loua M, Traoré A, Kolié M, Malano ER, Heleze E, Bocquin A, Mély S, Raoul H, Caro V, Cadar D, Gabriel M, Pahlmann M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Impouma B, Diallo AK, Formenty P, Van Herp M, Günther S: **Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea**. N Engl J Med. 2014 Oct 9;371(15):1418-25.

Barrett AJ: **The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage**. 1978. Agents Actions. 1994 Dec;43(3-4):194-200; discussion 200-1.

Behner L: **Charakterisierung des Glykoproteins G des neu entdeckten afrikanischen Henipavirus GH-M74a**. Masterarbeit an der medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg. 2004

Bonaparte MI, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Mungall BA, Bishop KA, Choudhry V, Dimitrov DS, Wang LF, Eaton BT, Broder CC: **Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:10652-10657.

Bossart KN, McEachern JA, Hickey AC, Choudhry V, Dimitrov DS, Eaton BT, Wang LF: **Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems**. *J Virol Methods* 2007, **142**:29-40.

Bossart KN, Wang LF, Flora MN, Chua KB, Lam SK, Eaton BT, Broder CC: **Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins**. *J Virol* 2002, **76**:11186-11198.

Bossart KN, Zhu Z, Middleton D, Klippel J, Crameri G, Bingham J, McEachern JA, Green D, Hancock TJ, Chan YP, et al: **A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection**. *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000642.

Bowden TA, Crispin M, Harvey DJ, Aricescu AR, Grimes JM, Jones EY, Stuart DI: **Crystal structure and carbohydrate analysis of Nipah virus attachment glycoprotein: a template for antiviral and vaccine design**. *J Virol* 2008, **82**:11628-11636.

Broder CC: **Henipavirus outbreaks to antivirals: the current status of potential therapeutics**. *Curr Opin Virol* 2012, **2**:176-187.

Butler D: **Fatal fruit bat virus sparks epidemics in southern Asia**. *Nature* 2004, **429**:7.

Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T: **Bats: important reservoir hosts of emerging viruses.** Clin Microbiol Rev. 2006 Jul;19(3):531-45. Review.

CDC: **Outbreak of Hendra-like virus-Malaysia and Singapore, 1998-1999.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999a, 48, (13), 265-9.

CDC: **Update: outbreak of Hendra-like virus-Malaysia and Singapore, 1998-1999.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1999b, 48, (16), 335-7.

Chang A, Dutch RE: **Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end.** Viruses. 2012 Apr;4(4):613-36.

Cherpillod P, Beck K, Zurbriggen A, Wittek R: **Sequence analysis and expression of the attachment and fusion proteins of canine distemper virus wild-type strain A75/17.** J Virol. 1999 Mar;73(3):2263-9.

Choi C: **Nipah's return. The lethal "flying fox" virus may spread between people.** Sci Am 2004, **291**:21A, 22.

Chong HT, Kamarulzaman A, Tan CT, Goh KJ, Thayaparan T, Kunjapan SR, Chew NK, Chua KB, Lam SK: **Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin.** Ann Neurol 2001, **49**:810-813.

Chua KB: **Nipah virus outbreak in Malaysia.** J Clin Virol 2003, **26**:265-275.

Chua KB, Chua BH, Wang CW: **Anthropogenic deforestation, El Niño and the emergence of Nipah virus in Malaysia.** Malays J Pathol 2002, **24**:15-21.

Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, Ksiazek TG, Zaki SR, Paul G, Lam SK, Tan CT: **Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia.** Lancet 1999, **354**:1257-1259.

Chua KB, Koh CL, Hooi PS, Wee KF, Khong JH, Chua BH, Chan YP, Lim ME, Lam SK: **Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes.** Microbes Infect 2002, **4**:145-151.

Chua KB, Lam SK, Tan CT, Hooi PS, Goh KJ, Chew NK, Tan KS, Kamarulzaman A, Wong KT: **High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid.** Ann Neurol 2000, **48**:802-805.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH: **One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution.** Proc Natl Acad Sci U S A 1989, **86**:2172-2175.

Coleman JR, Papamichail D, Skiena S, Fitcher B, Wimmer E, Mueller S: **Virus attenuation by genome-scale changes in codon pair bias.** Science. 2008 Jun 27;320(5884):1784-7.

Daukas G, Zigmond SH: **Inhibition of receptor-mediated but not fluid-phase endocytosis in polymorphonuclear leukocytes.** J Cell Biol. 1985 Nov;101(5 Pt 1):1673-9.

DeFrees SL, Wilson DE: **Eidolon helvum.** vol. 312. pp. 1-5. Mammalian Species; 1988:1-5.

de Wit E, Prescott J, Falzarano D, Bushmaker T, Scott D, Feldmann H, Munster VJ: **Foodborne transmission of nipah virus in Syrian hamsters.** PLoS Pathog. 2014 Mar 13;10(3):e1004001.

de Wit E, Bushmaker T, Scott D, Feldmann H, Munster VJ: **Nipah virus transmission in a hamster model.** PLoS Negl Trop Dis. 2011 Dec;5(12):e1432.

Diederich S, Sauerhering L, Weis M, Altmeppen H, Schaschke N, Reinheckel T, Erbar S, Maisner A: **Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment.** J Virol. 2012 Apr;86(7):3736-45.

Diederich S, Dietzel E, Maisner A: **Nipah virus fusion protein: influence of cleavage site mutations on the cleavability by cathepsin L, trypsin and furin.** Virus Res 2009, **145**:300-306.

Diederich S, Moll M, Klenk HD, Maisner A: **The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment.** J Biol Chem 2005, **280**:29899-29903.

Diederich S, Thiel L, Maisner A: **Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry.** Virology 2008, **375**:391-400.

Drexler JF, Corman VM, Gloza-Rausch F, Seebens A, Annan A, Ipsen A, Kruppa T, Müller MA, Kalko EK, Adu-Sarkodie Y, et al: **Henipavirus RNA in African bats.** PLoS One 2009, **4**:e6367.

Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, Rasche A, Yordanov S, Seebens A, et al: **Bats host major mammalian paramyxoviruses.** Nat Commun 2012, **3**:796.

Eaton BT, Wright PJ, Wang LF, Sergeyev O, Michalski WP, Bossart KN, Broder CC: **Henipaviruses: recent observations on regulation of transcription and the nature of the cell receptor.** Arch Virol Suppl 2004:122-131.

Enserink M: **Emerging infectious diseases. Nipah virus (or a cousin) strikes again.** Science 2004, **303**:1121.

Epand RM: **Fusion peptides and the mechanism of viral fusion.** Biochim Biophys Acta. 2003 Jul 11;1614(1):116-21.

Epstein JH, Field HE, Luby S, Pulliam JR, Daszak P: **Nipah virus: impact, origins, and causes of emergence.** Curr Infect Dis Rep 2006, **8**:59-65.

Field HE, Barratt PC, Hughes RJ, Shield J, Sullivan ND: **A fatal case of Hendra virus infection in a horse in north Queensland: clinical and epidemiological features.** *Aust Vet J* 2000, **78**:279-280.

Fogarty R, Halpin K, Hyatt AD, Daszak P, Mungall BA: **Henipavirus susceptibility to environmental variables.** *Virus Res* 2008, **132**:140-144.

Geisbert TW, Mire CE, Geisbert JB, Chan YP, Agans KN, Feldmann F, Fenton KA, Zhu Z, Dimitrov DS, Scott DP, Bossart KN, Feldmann H, Broder CC: **Therapeutic treatment of Nipah virus infection in nonhuman primates with a neutralizing human monoclonal antibody.** *Sci Transl Med.* 2014 Jun 25;6(242):242ra82.

Gnirss K, Kühl A, Karsten C, Glowacka I, Bertram S, Kaup F, Hofmann H, Pöhlmann S: **Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression.** *Virology.* 2012 Mar 1;424(1):3-10.

Griffiths G, Quinn P, Warren G: **Dissection of the Golgi complex. I. Monensin inhibits the transport of viral membrane proteins from medial to trans Golgi cisternae in baby hamster kidney cells infected with Semliki Forest virus.** *J Cell Biol.* 1983 Mar;96(3):835-50.

Guillaume V, Aslan H, Ainouze M, Guerbois M, Wild TF, Buckland R, Langedijk JP: **Evidence of a potential receptor-binding site on the Nipah virus G protein (NiV-G): identification of globular head residues with a role in fusion promotion and their localization on an NiV-G structural model.** *J Virol.* 2006b Aug;80(15):7546-54.

Gurley ES, Montgomery JM, Hossain MJ, Bell M, Azad AK, Islam MR, Molla MA, Carroll DS, Ksiazek TG, Rota PA, et al: **Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community.** *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:1031-1037.

Halpin K, Hyatt AD, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, Epstein JH, Rahman SA, Hughes T, Smith C, Field HE, et al: **Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission.** *Am J Trop Med Hyg* 2011, **85**:946-951.

Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, Bellini WJ, Rota PA: **Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus.** *Virology* 2000, **271**:334-349.

Hayman DT, Wang LF, Barr J, Baker KS, Suu-Ire R, Broder CC, Cunningham AA, Wood JL: **Antibodies to henipavirus or henipa-like viruses in domestic pigs in Ghana, West Africa.** *PLoS One.* 2011;6(9):e25256.

Hayman DT, Suu-Ire R, Breed AC, McEachern JA, Wang L, Wood JL, Cunningham AA: **Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats.** *PLoS One.* 2008 Jul 23;3(7):e2739.

Hebert DN, Molinari M: **In and Out of the ER: Protein Folding, Quality Control, Degradation, and Related Human Diseases.** *Physiological Reviews*. 2007 Oct 1 Vol. 87no. 4, 1377-1408

Hess IM, Massey PD, Walker B, Middleton DJ, Wright TM: **Hendra virus: what do we know?** *N S W Public Health Bull* 2011, **22**:118-122.

Honey K, Rudensky AY: **Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation.** *Nat Rev Immunol*. 2003 Jun;3(6):472-82. Review.

Hyatt AD, Zaki SR, Goldsmith CS, Wise TG, Hengstberger SG: **Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals.** *Microbes Infect* 2001, **3**:297-306.

Khan MS, Hossain J, Gurley ES, Nahar N, Sultana R, Luby SP: **Use of infrared camera to understand bats' access to date palm sap: implications for preventing Nipah virus transmission.** *Ecohealth* 2010, **7**:517-525.

Klenk HD, Garten W: **Host cell proteases controlling virus pathogenicity.** *Trends Microbiol*. 1994 Feb;2(2):39-43. Review.

Kozak M: **Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes.** *Gene*. 2005 Nov 21;361:13-37. Review.

Krüger N, Hoffmann M, Weis M, Drexler JF, Müller MA, Winter C, Corman VM, Gützkow T, Drosten C, Maisner A, Herrler G: **Surface glycoproteins of an African henipavirus induce syncytium formation in a cell line derived from an African fruit bat, *Hypsignathus monstrosus*.** *J Virol*. 2013 Dec;87(24):13889-91

Kyhse-Andersen, J: **Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.** *J Biochem Biophys Methods*, 1984,10, 203-209.

Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G: **A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation.** *J Mol Biol*. 1970 Jan 14;47(1):69-85.

Lamb RA, Parks GD: **Paramyxoviridae: The viruses and their replication.** In: Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Straus SE, Howley PM et al., editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1449–1496. 2007

Lamb RA, and Kolakofsky D: **Paramyxoviridae: The viruses and their replication.** In *Fields Virology*. (Knipe, DM, Howley, PM, Griffin, DE, Lamb, RA, Martin, MA, Roizman, B, Straus, SE, eds), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001, 4th ed, 1305- 1340.

Lawrence P, Escudero Pérez B, Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Drosten C, Volchkov V: **Surface glycoproteins of the recently identified African Henipavirus promote viral entry and cell fusion in a range of human, simian and bat cell lines.** *Virus Res*. 2014 Mar 6;181:77-80.

Lisanti MP, Sargiacomo M, Graeve L, Saltiel AR, Rodriguez-Boulan E: **Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:9557-9561.

Maar D, Harmon B, Chu D, Schulz B, Aguilar HC, Lee B, Negrete OA: **Cysteines in the stalk of the nipah virus G glycoprotein are located in a distinct subdomain critical for fusion activation.** *J Virol* 2012, **86**:6632-6642.

Maisner A, Mrkic B, Herrler G, Moll M, Billeter MA, Cattaneo R, Klenk HD: **Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity.** *J Gen Virol*. 2000 Feb;**81**(Pt 2):441-9.

Marsh GA, de Jong C, Barr JA, Tachedjian M, Smith C, Middleton D, Yu M, Todd S, Foord AJ, Haring V, et al: **Cedar virus: a novel Henipavirus isolated from Australian bats.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002836.

McGrath ME: **The lysosomal cysteine proteases.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1999;**28**:181-204. Review.

Michalski WP, Crameri G, Wang L, Shiell BJ, Eaton B: **The cleavage activation and sites of glycosylation in the fusion protein of Hendra virus.** *Virus Res* 2000, **69**:83-93.

Mendez DH, Judd J, Speare R: **Unexpected result of Hendra virus outbreaks for veterinarians, Queensland, Australia.** *Emerg Infect Dis*. 2012 Jan;**18**(1):83-5.

Middleton D: **Hendra Virus.** *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2014 Sep 30. pii: S0749-0739(14)00062-5.

Middleton DJ, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, Braun MA, Westbury HA, Halpin K, Daniels PW : **Experimental Nipah virus infection in pteropid bats (*Pteropus poliocephalus*).** *J Comp Pathol*. 2007 May;**136**(4):266-72.

Middleton DJ, Westbury HA, Morrissy CJ, van der Heide BM, Russell GM, Braun MA, Hyatt AD: **Experimental Nipah virus infection in pigs and cats.** *J Comp Pathol*. 2002 Feb-Apr;**126**(2-3):124-36.

Modrow S, Falke D, Truyen U: **Molekulare Virologie.** Spektrum Akademischer Verlag; 2003.

Mohd Nor MN, Gan CH, Ong BL: **Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia.** *Rev Sci Tech* 2000, **19**:160-165.

Moll M, Diederich S, Klenk HD, Czub M, Maisner A: **Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site.** *J Virol* 2004, **78**:9705-9712.

Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Halpin K, Bingham J, Eaton BT, Broder CC: **Vertical transmission and fetal replication of Nipah virus in an experimentally infected cat.** *J Infect Dis* 2007, **196**:812-816.

Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A, Gleeson L, Westbury H, Hiley L, Selvey L, Rodwell B: **A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans.** *Science* 1995, **268**:94-97.

Negrete OA, Chu D, Aguilar HC, Lee B: **Single amino acid changes in the Nipah and Hendra virus attachment glycoproteins distinguish ephrinB2 from ephrinB3 usage.** *J Virol* 2007, **81**:10804-10814.

Negrete OA, Wolf MC, Aguilar HC, Enterlein S, Wang W, Mühlberger E, Su SV, Bertolotti-Ciarlet A, Flick R, Lee B: **Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus.** *PLoS Pathog.* 2006 Feb;2(2):e7.

Negrete OA, Levroney EL, Aguilar HC, Bertolotti-Ciarlet A, Nazarian R, Tajyar S, Lee B: **EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus.** *Nature* 2005, **436**:401-405.

Nowak, R.M: **Walker's Bats of the world.** 1994, The John Hopkins University Press

O' Brien J: **Bats of the Western Indian Ocean Islands.** pp. 259-290: *Animals*; 2011:259-290.

Oda K, Ikehara Y: **Weakly basic amines inhibit the proteolytic conversion of proalbumin to serum albumin in cultured rat hepatocytes.** *Eur J Biochem.* 1985 Nov 4;152(3):605-9.

O'Shea TJ, Cryan PM, Cunningham AA, Fooks AR, Hayman DT, Luis AD, Peel AJ, Plowright RK, Wood JL : **Bat flight and zoonotic viruses.** *Emerg Infect Dis.* 2014 May;20(5):741-5.

O'Sullivan JD, Allworth AM, Paterson DL, Snow TM, Boots R, Gleeson LJ, Gould AR, Hyatt AD, Bradfield J: **Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses.** *Lancet* 1997, **349**:93-95.

Pager CT, Craft WW Jr, Patch J, Dutch RE: **A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L.** *Virology.* 2006 Mar 15;346(2):251-7.

Pager CT, Dutch RE: **Cathepsin L is involved in proteolytic processing of the Hendra virus fusion protein.** *J Virol.* 2005 Oct;79(20):12714-20.

Parashar UD, Sunn LM, Ong F, Mounts AW, Arif MT, Ksiazek TG, Kamaluddin MA, Mustafa AN, Kaur H, Ding LM, et al: **Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia.** *J Infect Dis* 2000, **181**:1755-1759.

Pernet O, Schneider BS, Beaty SM, LeBreton M, Yun TE, Park A, Zachariah TT, Bowden TA, Hitchens P, Ramirez CM, Daszak P, Mazet J, Freiberg AN, Wolfe ND, Lee B: **Evidence for henipavirus spillover into human populations in Africa.** *Nat Commun.* 2014 Nov 18;5:5342.

Pernet O, Beaty S, Lee B: **Functional rectification of the newly described African henipavirus fusion glycoprotein (Gh-M74a).** *J Virol.* 2014 May;88(9):5171-6.

Ploquin A, Szécsi J, Mathieu C, Guillaume V, Barateau V, Ong KC, Wong KT, Cosset FL, Horvat B, Salvetti A: **Protection against henipavirus infection by use of recombinant adeno-associated virus-vector vaccines.** *J Infect Dis* 2013, **207**:469-478.

Popa A, Carter JR, Smith SE, Hellman L, Fried MG, Dutch RE: **Residues in the hendra virus fusion protein transmembrane domain are critical for endocytic recycling.** *J Virol.* 2012 Mar;86(6):3014-26

Rahman MA, Hossain MJ, Sultana S, Homaira N, Khan SU, Rahman M, Gurley ES, Rollin PE, Lo MK, Comer JA, Lowe L, Rota PA, Ksiazek TG, Kenah E, Sharker Y, Luby SP: **Date palm sap linked to Nipah virus outbreak in Bangladesh, 2008.** *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 Jan;12(1):65-72.

Popa A, Pager CT, Dutch RE: **C-terminal tyrosine residues modulate the fusion activity of the Hendra virus fusion protein.** *Biochemistry* 2011, **50**:945-952.

Rockx B, Bossart KN, Feldmann F, Geisbert JB, Hickey AC, Brining D, Callison J, Safronetz D, Marzi A, Kercher L, et al: **A novel model of lethal Hendra virus infection in African green monkeys and the effectiveness of ribavirin treatment.** *J Virol* 2010, **84**:9831-9839.

Schorfberg K, Matsuyama S, Kabsch K, Delos S, Bouton A, White J: **Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein.** *J Virol.* 2006 Apr;80(8):4174-8.

Sejvar JJ, Hossain J, Saha SK, Gurley ES, Banu S, Hamadani JD, Faiz MA, Siddiqui FM, Mohammad QD, Mollah AH, Uddin R, Alam R, Rahman R, Tan CT, Bellini W, Rota P, Breiman RF, Luby SP: **Long-term neurological and functional outcome in Nipah virus infection.** *Ann Neurol.* 2007 Sep;62(3):235-42.

Selvey L, Sheridan J: **Outbreak of Severe Respiratory Disease in Humans and Horses Due to a Previously Unrecognized Paramyxovirus.** *J Travel Med* 1995, **2**:275.

Slotte JP: **Sphingomyelin-cholesterol interactions in biological and model membranes.** *Chem Phys Lipids.* 1999 Nov;102(1-2):13-27. Review.

Tamin A, Harcourt BH, Ksiazek TG, Rollin PE, Bellini WJ, Rota PA: **Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus.** *Virology* 2002, **296**:190-200.

Tan CT, Goh KJ, Wong KT, Sarji SA, Chua KB, Chew NK, Murugasu P, Loh YL, Chong HT, Tan KS, Thayaparan T, Kumar S, Jusoh MR: **Relapsed and late-onset Nipah encephalitis.** *Ann Neurol.* 2002 Jun;51(6):703-8.

Tashiro M, McQueen NL, Seto JT: **Determinants of organ tropism of sendai virus.** *Front Biosci.* 1999 Oct 1;4:D642-5. Review.

- Tashiro M, Fujii Y, Nakamura K, Homma M: **Cell-mediated immunity induced in mice after vaccination with a protease activation mutant, TR-2, of Sendai virus.** *J Virol.* 1988 Jul;62(7):2490-7.
- Thiel L, Diederich S, Erbar S, Pfaff D, Augustin HG, Maisner A: **Ephrin-B2 expression critically influences Nipah virus infection independent of its cytoplasmic tail.** *Virol J.* 2008 Dec 24;5:163
- Turk B, Turk D, Turk V: **Protease signalling: the cutting edge.** *EMBO J.* 2012 Apr 4;31(7):1630-43. Review.
- Valbuena G, Halliday H, Borisevich V, Goetz Y, Rockx B: **A human lung xenograft mouse model of Nipah virus infection.** *PLoS Pathog.* 2014 Apr 3;10(4):e1004063.
- Van Meer G, Lisman Q: **Sphingolipid transport: rafts and translocators.** *J Biol Chem.* 2002 Jul 19;277(29):25855-8.
- Von Messling V, Cattaneo R: **Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function.** *J Virol.* 2002 May;76(9):4172-80.
- Vogt C, Eickmann M, Diederich S, Moll M, Maisner A: **Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins.** *J Virol* 2005, **79**:3865-3872.
- Wang L, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA, Bellini WJ, Eaton BT: **Molecular biology of Hendra and Nipah viruses.** *Microbes Infect.* 2001 Apr;3(4):279-87. Review.
- Wang L.F., Yu M., Hansson E., Pritchard L.I., Shiell B., Michalski W.P., Eaton B.T.: **The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae.** vol. 74. pp. 9972-9979: *J Virol.*; 2000:9972-9979.
- Wang L, Harcourt BH, Yu M, Tamin A, Rota PA, Bellini WJ, Eaton BT: **Molecular biology of Hendra and Nipah viruses.** *Microbes Infect* 2001, **3**:279-287.
- Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, Loosmore S, Audonnet JC, Roth JA, Czup M: **Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge.** *J Virol* 2006, **80**:7929-7938.
- Weingartl H, Czup S, Copps J, Berhane Y, Middleton D, Marszal P, Gren J, Smith G, Ganske S, Manning L, Czup M: **Invasion of the central nervous system in a porcine host by nipah virus.** *J Virol* 2005, **79**:7528-7534.
- Weis M, Behner L, Hoffmann M, Krüger N, Herrler G, Drosten C, Drexler JF, Dietzel E, Maisner A: **Characterization of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins.** *J Gen Virol.* 2014 Mar;95(Pt 3):539-48.
- Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquier B, Fevre-Montange M, Bernard A, Loth P, Georges-Courbot MC, Chevallier M, Akaoka H, et al: **A golden hamster model for human acute Nipah virus infection.** *Am J Pathol* 2003, **163**:2127-2137.

Wong KT, Shieh WJ, Zaki SR, Tan CT: **Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis.** Springer Semin Immunopathol. 2002b;24(2):215-28.

Wong KT, Shieh WJ, Kumar S, Norain K, Abdullah W, Guarner J, Goldsmith CS, Chua KB, Lam SK, Tan CT, Goh KJ, Chong HT, Jusoh R, Rollin PE, Ksiazek TG, Zaki SR: **Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis.** Am J Pathol. 2002a Dec;161(6):2153-67.

Xu K, Rajashankar KR, Chan YP, Himanen JP, Broder CC, Nikolov DB: **Host cell recognition by the henipaviruses: crystal structures of the Nipah G attachment glycoprotein and its complex with ephrin-B3.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 22;105(29):9953-8.

Yob JM, Field H, Rashdi AM, Morrissy C, van der Heide B, Rota P, bin Adzhar A, White J, Daniels P, Jamaluddin A, Ksiazek T : **Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia.** Emerg Infect Dis. 2001 May-Jun;7(3):439-41.

VII Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| BSL-4 | <i>biosafety level 4</i> |
| Ci | Curie |
| C-Terminus | Carboxyterminus |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dH ₂ O | deionisiertes Wasser |
| DMEM | <i>Dulbecco`s modification of Eagle`s medium</i> |
| ER | endoplasmatisches Retikulum |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ECL | <i>Enhanced Chemiluminescence</i> |
| FCS | fötales Kälberserum |
| HeV | Hendravirus |
| HnV | Henipavirus |
| HRP | <i>horsereadish peroxidase</i> |
| Ig (IgG) | Immunglobulin (Ig Klasse G) |
| kb | Kilobase |
| LB | <i>Liquid Broth</i> |
| μ | Mikro |
| M | Molar |
| MDCK | <i>Madin Darby canine kidney</i> |
| ME | β-Mercaptoethanol |
| MeAc | Methanol-Aceton |
| MEM | <i>Minimal Essential Medium</i> |
| NiV | Nipahvirus |

| | |
|------------|--|
| N-Terminus | Aminoterminus |
| OD | optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pre-SP | pre-Signalpeptid |
| p.t. | nach Transfektion (<i>post transfection</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| Tab. | Tabelle |
| TMD | Transmembrandomäne |
| U | Einheit (Unit) |
| ü.N. | über Nacht |
| wt | Wildtyp |

Abkürzungen der Aminosäuren

| | | | | | |
|---|-----|--------------|---|-----|------------|
| A | Ala | Alanin | M | Met | Methionin |
| C | Cys | Cystein | N | Asn | Asparagin |
| D | Asp | Aspartat | P | Pro | Prolin |
| E | Glu | Glutamat | Q | Gln | Glutamin |
| F | Phe | Phenylalanin | R | Arg | Arginin |
| G | Gly | Glyzin | S | Ser | Serin |
| H | His | Histidin | T | Thr | Threonin |
| I | Ile | Isoleucin | V | Val | Valin |
| K | Lys | Lysin | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin | Y | Tyr | Tyrosin |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Tab. 1: | Vertreter der Henipaviren mit charakteristischen Eigenschaften..... | 1 |
| Abb. 1.1: | Geographische Verbreitung der Henipavirus-Ausbrüche sowie der Flughunde der Familie <i>Pteropodidae</i> | 9 |
| Abb. 1.2: | Eine Flughundekolonie der Gattung <i>Eidolon helvum</i> „Zoologischen Garten“ in Kumasi, Ghana. | 10 |
| Abb. 1.3: | Pylogenetischer Stammbaum der Paramyxoviren basierend auf Sequenzanalysen der-Gen-Fragmente..... | 12 |
| Abb. 1.4: | Genomstruktur und Aminosäurevergleich der einzelnen Gene zwischen Hendra, Nipah sowie dem neu isolierten GH-M74a. | 13 |
| Abb. 1.5: | Schematische Darstellung der Henipaviren..... | 14 |
| Abb. 1.6: | Schematische Darstellung des Glykoprotein G von NiV und GH-M74a..... | 16 |
| Abb. 1.7: | Schematische Darstellung des Fusionsproteins F von NiV und GH-M74a. | 17 |
| Abb. 1.8: | Rolle des G-und F-Proteins im Replikationszyklus..... | 19 |
| Tab. 2: | Homologie der EphrinB2 und B3 DNA- und Aminosäuresequenzen in verschiedenen Spezies. | 21 |
| Abb. 2.1: | Arbeitsschritte bei der Klonierung der afrikanischen Henipavirus-Glykoproteine von M74..... | 25 |
| Abb. 2.2: | Immunfluoreszenz-Analyse der M74 Glykoproteine in MDCK- und Vero-Zellen..... | 27 |
| Abb. 2.3: | Fusionsaktivität der M74-Glykoproteine in HypNi/1.1- und Vero-Zellen. | 29 |
| Abb. 2.4: | Koexpression der beiden M74-Glykoproteine in HypNi/1.1 und Vero-Zellen. | 30 |
| Abb. 2.5: | Nachweis der Synzytienbildung in Henipavirus-permissiven Zelllinien..... | 32 |
| Abb. 2.6: | Heterotypischer Fusionsassay in Vero-Zellen..... | 33 |
| Abb. 2.7: | Western Blot Analyse des M74-F Proteins in verschiedenen Zelllinien..... | 35 |
| Abb. 2.8: | Overlay-Fusionsassay..... | 37 |
| Abb. 2.9: | Nachweis und Vergleich der M74-F und NiV-F Oberflächenexpression. | 38 |
| Abb. 2.10: | Proteinstabilität und Spaltungskinetik von M74-F. | 40 |
| Abb. 2.11: | Expression der NiV-M74-F-Chimären in MDCK-Zellen..... | 42 |
| Abb. 2.12: | Oberflächenexpression der F-Chimären in MDCK-Zellen. | 43 |
| Abb. 2.13: | Spaltungskinetik und Proteinstabilität der F-Chimären. | 44 |

| | |
|--|-----|
| Abb. 2.14: Fusionsaktivität der F-Chimären in Vero-Zellen. | 46 |
| Abb. 2.15: Schematische Übersicht der <i>in frame</i> Startcodons des M74-F-Proteins sowie der beiden Startcodon-Mutanten. | 47 |
| Abb. 2.16: Western Blot Analyse der M74-F M119T und M1T-Mutante..... | 48 |
| Abb. 2.17: Schematische Darstellung der M74-F (+A) Mutanten..... | 49 |
| Abb. 2.18: Western Blot Analyse der M74-F (+A) Mutanten..... | 50 |
| Abb. 2.19: Schematische Darstellung der I91M-Mutanten. | 51 |
| Abb. 2.20: Expression der M74-F I91M Mutanten im Vergleich zu M74-F. | 52 |
| Abb. 2.21: Koexpression der M74-F I91M Mutanten mit M74-G in Vero- und HypNi/1.1-Zellen. | 53 |
| Abb. 2.22: Koexpression der beiden F-Proteine in Vero-Zellen. | 54 |
| Abb. 2.23: Einfluss von Sucrose auf die Spaltung der Fusionsproteine. | 56 |
| Abb. 2.24: Einfluss von Monensin auf die Spaltung der Fusionsproteine. | 57 |
| Abb. 2.25: Einfluss von Ammoniumchlorid auf die Spaltung der Fusionsproteine. | 58 |
| Abb. 2.26: Einfluss des Cysteinproteaseinhibitors E64d auf die Spaltung der Fusionsproteine. | 59 |
| Abb. 5.1: Struktur von Sulfo-NHS- bzw. Sulfo-NHS-LC-Biotin mit wichtigen Moleküldomänen. | 96 |
| Abb. 5.2: Darstellung der verschiedenen Schichten des Blots..... | 99 |
| Abb. 5.3: Schema eines Overlay-Fusionsassays..... | 103 |

Sequenzen

Sequenz des GH-M74a-F in pCAGGS

1741 NotI
SmaI
AvaI
XmaI
 cccggggcgg ccgcgcaagc aatatcccag gaaacaaccc tggtagagca caatgaagaa
 gggccccgcc ggcgcgttcg ttataggggc ctttggtggg accatgtcgt gttacttctt
GH74 F >>.....>
m k

1801 AvaI
XhoI
XbaI
 aaagacggac aatcccacaa tatcaaagag gggtcacaac cattctcgag gaatcaaata
 tttctgcctg ttaggggtgt atagtttctc ccagtggtg gtaagagctc cttagtttag
 >.....GH74 F.....>
 k k t d n p t i s k r g h n h s r g i k

1861 HaeII
Eco4VII
BseMII
BspCNI
 tagagcgcta ctacagagaga cagataatta ttccaatggg ctaatagttg agaatttagt
 atctcgcgat gagtctctct gtctattaat aaggttaccc gattatcaac tcttaaatca
 >.....GH74 F.....>
 s r a l l r e t d n y s n g l i v e n l

1921 tagaaactgt catcatccaa gtaagaacaa tctaaactat actaagacac aaaaaagaga
 atctttgaca gtagtaggtt cattctgtgt agatttgata tgattctgtg ttttttctct
 >.....GH74 F.....>
 v r n c h h p s k n n l n y t k t q k r

1981 ttctacaatc ctttatcgtg tggaagagag aaaaggacat tatccaaaga ttaaacatct
 aagatgtagt ggaatagcac accttctctc ttttctgtg ataggtttct aatttgtaga
 >.....GH74 F.....>
 d s t i p y r v e e r k g h y p k i k h

2041 tattgataaa tcttacaagc atataaaaag aggggaagaga agaaatggtc ataattggaa
 ataactatct agaattgtcg tatatttttc tcccttctct tctttaccag tattaccctt
 >.....GH74 F.....>
 l i d k s y k h i k r g k r r n g h n g

2101 PstI
 cattataact ataattctgt tgttgatttt aattttgaag acacagatga gtgaagggtc
 gtaatatgta tattaagaca acaactaaaa ttaaaacttc tgtgtctact cacttccacg
 >.....GH74 F.....>
 n i i t i i l l l i l l k t q m s e g

2161 MlyI
PleI
 tatccattac gagactctaa gtaagatcgg attaataaag ggaatcacca gagagtacaa
 ataggtaatg ctctgagatt cattctagcc taattatttc ccttagtggt ctctcatggt
 >.....GH74 F.....>
 a i h y e t l s k i g l i k g i t r e y

2221 agtcaaagga actccgtcaa gtaaagacat agtcatcaaa ttgattccga atgtcacggg
 tcagtttccct tgaggcaggt catttctgta tcagtagttt aactaaggct tacagtggcc
 >.....GH74 F.....>
 k v k g t p s s k d i v i k l i p n v t

2281 tcttaacaag tgcacgaaca tatcaatgga aaactataaa gaacaacttg acaaaatact
 agaattgttc acgtgcttgt atagttacct tttgatattt cttgttgaac tgttttatga
 >.....GH74 F.....>
 g l n k c t n i s m e n y k e q l d k i

2341 aattcctatt aacaacataa ttgaattgta tgcaaaactca actaaatcag cccttgggaa
 ttaaggataa ttgttgattt aacttaacat acgtttgagt tgatttagtc ggggaccctt
 >.....GH74 F.....>
 l i p i n n i i e l y a n s t k s a p g

2401 tgcacgtttt gctggcggtta taattgcagg agtggcatta ggtgttgcag cggcagccca
 acgtgcaaaa cgaccgcaat attaacgtcc tcaccgtaat ccacaacgtc gccgtcgggt
 >.....GH74 F.....>
 n a r f a g v i i a g v a l g v a a a a

2461 aataactgcc ggcattgcac tgcattgaagc tcgacagaat gcagagagaa ttaattctct
 ttattgacgg ccgtaacgtg acgtacttcg agctgtctta cgtctctctt aattagagaa
 >.....GH74 F.....>
 q i t a g i a l h e a r q n a e r i n l

2521 aaaggatagc atttctgcc ctaacaacgc agtagcagaa ctccaggaag caactgggtg
 tttcctatcg taaagacggt gattgttgcg tcactgtctt gaggtccttc gttgaccacc
 >.....GH74 F.....>
 l k d s i s a t n n a v a e l q e a t g

2581 aatagtaaat gtcattacag gaatgcaaga ttacatcaat acaaatctag tccgcagat
 ttatcattta cagtaatgtc cttacgttct aatgtagtta tgttttagatc agggcgtcta
 >.....GH74 F.....>
 g i v n v i t g m q d y i n t n l v p q

2641 tgacaaactg caatgtagtc agatcaaaac ggcattagac atatctctct cccaatacta
 actgtttgac gttacatcag tctagttttg ccgtaatctg tatagagaga gggttatgat
 >.....GH74 F.....>
 i d k l q c s q i k t a l d i s l s q y

BmgT120I
AvaII
Sau96I
SspI TaqII

2701 ttcagaaata ttaacagtgt tcggtccaaa ccttcaaaat ccagtaacta cttccatgtc
 aagtctttat aattgtcaca agccagggtt ggaagtttta ggtcattgat gaagggtacag
 >.....GH74 F.....>
 y s e i l t v f g p n l q n p v t t s m

2761 aatacaagcc atatacacaat cttttggggg aaatatagat ttgctcttaa acctactagg
 ttatgttcgg tatagtgtta ggaaaccccc tttatatcta aacgagaatt tggatgatcc
 >.....GH74 F.....>
 s i q a i s q s f g g n i d l l l n l l

2821 ttacactgca aacgacttat tggatttgct cgaaagtaaa agtataacag gccaaataac
 aatgtgacgt ttgctgaata acctaaacga gctttcattt tcatattgtc cggtttattg
 >.....GH74 F.....>
 g y t a n d l l d l l e s k s i t g q i

2881 atacataaat cttgaacatt acttcatggt aatcagagta tattatccta taatgacaac
 tatgtattta gaacttgtaa tgaagtacca ttagtctcat ataataggat attactgttg
 >.....GH74 F.....>
 t y i n l e h y f m v i r v y y p i m t

BclI

2941 aatcagcaat gcttatgtcc aggaattgat caaaattagc ttcaatgtcg atggcagtga
 ttagtcgtta cgaatacagg tccttaacta gttttaatcg aagttacagc taccgtcact
 >.....GH74 F.....>
 t i s n a y v q e l i k i s f n v d g s

3001 atgggtatct cttgtaccct cgtatatatt gattagaaac tcatatctct caaacataga
 tacccataga gaacatggga gcatatataa ctaatctttg agtatagaga gtttgtatct
 >.....GH74 F.....>
 e w v s l v p s y i l i r n s y l s n i

TsoI BspHI

3061 catatcagaa tgtctcataa ccaaaaattc agtgatatgt cgtcatgact ttgcaatgcc
 gtatagtctt acagagtatt ggtttttaag tcactatata gcagtactga aacgttacgg
 >.....GH74 F.....>
 d i s e c l i t k n s v i c r h d f a m

BsmI

3121 aatgagttac accttaaagg aatgcctaac tggagacact gaaaagtgtc cgagagaggg
 ttactcaatg tggaatttcc ttacggattg acctctgtga cttttcacag gctctctcgg
 >.....GH74 F.....>
 p m s y t l k e c l t g d t e k c p r e

NdeI

3181 tgttgtaacc tcatatgtcc caagatttgc tatctccggg ggagtgattt atgctaattg
 acaacattgg agtatacagg gttctaaacg atagaggccc cctcactaaa tacgattaac
 >.....GH74 F.....>
 a v v t s y v p r f a i s g g v i y a n

3241 tctaagtaca acatgtcaat gctatcaaac tggcaaagta attgctcaag acggcagcca
agattcatgt tgtacagtta cgatagtttg accgtttcat taacgagttc tgcgctcggg
>.....GH74 F.....>
c l s t t c q c y q t g k v i a q d g s

3301 aacattgatg atgatcgata atcaaacatg ttcaatagta agaattgaag aaatcctcat
ttgtaactac tactagctat tagttgttac aagttatcat tcttaacttc tttaggagta
>.....GH74 F.....>
q t l m m i d n q t c s i v r i e e i l

3361 atcaacaggg aaatatctgg gaagtcagga gtacaatacg atgcatgtgt cagtcggcaa
tagttgtccc tttatagacc cttagtcct catgttatgc tacgtacaca gtcagccgtt
>.....GH74 F.....>
i s t g k y l g s q e y n t m h v s v g

3421 tctgtcttc actgacaagc tggacataac aagtcaaatt tccaacatca accaatccat
aggacagaag tgactgttcg acctgtattg ttcagtttaa aggttgtagt tggtaggta
>.....GH74 F.....>
n p v f t d k l d i t s q i s n i n q s

3481 tgaacaatcc aaattttatc tagataagtc taaggctata cttgacaaga taaatctcaa
actgtttagg tttaaaatag atctattcag attccgatat gaactgttct atttagagtt
>.....GH74 F.....>
i e q s k f y l d k s k a i l d k i n l

3541 cttaattggc tctgtaccga tatcaatact tttcataatt gcatcttat cattgattct
gaattaaccg agacatggct atagttatga aaagtattaa cgctagaata gtaactaaga
>.....GH74 F.....>
n l i g s v p i s i l f i i a i l s l i

3601 ctctattata acttttgtga ttgtgatgat aattgtcaga agatataaca aatacactcc
gagataatat tgaaaacact aacactacta ttaacagtct tctatattgt ttatgtgagg
>.....GH74 F.....>
l s i i t f v i v m i i v r r y n k y t

3661 tcttataaac tctgatccat ccagtaggag gactactata caggacgtat atatcatccc
agaatatttg agactaggta ggtcatcttc ctcatgatat gtctgcata tatagtaggg
>.....GH74 F.....>
p l i n s d p s s r r s t i q d v y i i

3721 gaaccccgga gaacattcga ttagatcagc tgctcgatca attgacagag atcgagattg
cttggggcct cttgtaagct aatctagtcg acgagctagt taactgtctc tagctctaac
>.....GH74 F.....>
p n p g e h s i r s a a r s i d r d r d

3781 agctagcaga tctttttccc tctgcaaaaa attatgggga catcatgaag ccccttgagc
tcgatcgtct agaaaaaggg agacggtttt taataccctt gtagtacttc ggggaactcg
> GH74 F
-

Sequenz des GH-M74a-G in pCAGGS

```

      MslI                               XbaI
1  atgccgcaga agactgtgga attcattaac atgaattccc ctctagaaag aggggtcagc
   tacggcgctct tctgacacct taagtaattg tacttaaggg gagatctttc tccccagtcg
   >>.....GH-M74a-G.....>
      m p q k t v e f i n m n s p l e r g v s

61  actctttcag ataagaagac cctcaatcaa tctaaaatca ccaagcaggg gtattttggg
   tgagaaaagtc tattcttctg ggagttagtt agattttagt ggttcgtccc cataaaaccc
   >.....GH-M74a-G.....>
      t l s d k k t l n q s k i t k q g y f g

      BamHI
121  ttaggatccc acagtgagag aaattggaag aagcagaaga atcaaaatga tcattacatg
   aatcctaggg tgctactctc tttaaccttc ttctgtcttct tagttttact agtaatgtac
   >.....GH-M74a-G.....>
      l g s h s e r n w k k q k n q n d h y m

      BpuEI
      SmlI
181  actgtttcaa ccatgattct tgagatatta gttgtcctgg gcatcatggt taatctcata
   tgacaaaagtt ggtactaaga actctataat caacaggacc cgtagtataa attagagtat
   >.....GH-M74a-G.....>
      t v s t m i l e i l v v l g i m f n l i

241  gttttaacta tgggtgtatta tcagaatgac aacatcaatc aaaggatggc agaacttaca
   caaaattgat accacataat agtcttactg ttgtagttag tttcctaccg tcttgaatgt
   >.....GH-M74a-G.....>
      v l t m v y y q n d n i n q r m a e l t

      DraI
      SmaI
301  agcaatatca cagtcttgaa tttaaatctt aatcaattga caaacaaaat tcaaagagaa
   tcggttatagt gtcaggactt aaatttagaa ttagttaact gtttggttta agtttctctt
   >.....GH-M74a-G.....>
      s n i t v l n l n l n q l t n k i q r e

      AvrII
      StyI
361  attattccta ggatcactct tattgacaca gcaaccacca ttacaattcc tagtgccatt
   taataaggat cctagtgaga ataactgtgt cgttggtggt aatgtaagg atcacggtaa
   >.....GH-M74a-G.....>
      i i p r i t l i d t a t t i t i p s a i

421  acttacatat tagcaactct gacaaccaga atctcggaat tattgccgtc aatcaaccaa
   tgaatgtata atcggtgaga ctggttggtc tagagcctta ataacggcag ttagttggtt
   >.....GH-M74a-G.....>
      t y i l a t l t t r i s e l l p s i n q

      PshAI
481  aagtgtgagt tcaagacacc gacactgtgc ctgaatgact gcagaataaa ctgtacccca
   ttcacactca agttctgtgg ctgtgaacag gacttactga cgtcttattt gacatggggt
   >.....GH-M74a-G.....>
      k c e f k t p t l v l n d c r i n c t p

      BstXI
541  ccactaaacc cgtctgatgg agtgaaaatg agttctcttg ccactaactt ggttgccat
   ggtgatttgg gcagactacc tcacttttac tcaagagaac ggtgattgaa ccaacgtgta
   >.....GH-M74a-G.....>
      p l n p s d g v k m s s l a t n l v a h

```

ApaI
BanII
EcoO109I
PspOMI
 601 gggccctctc cctgtagaaa cttttcatcc gtacctacaa tttactatta toggattcca
 ccggggagag ggacatcttt gaaaagtagg catggatgtt aaatgataat agcctaaggt
 >.....GH-M74a-G.....>
 g p s p c r n f s s v p t i y y y r i p

Bst1107I
AccI
 661 ggattataca atagaacagc attggacgaa agatgtatac taaacccgag attgacaata
 cctaataatgt tatcttgtcg taacctgctt tctacatatg atttgggctc taactgttat
 >.....GH-M74a-G.....>
 g l y n r t a l d e r c i l n p r l t i

721 agcagtacaa aatttgctta tgtccactct gaatatgata aaaattgcac cagaggattc
 tcgtcatgtt ttaaacgaat acaggtgaga cttatactat ttttaacgtg gtctcctaag
 >.....GH-M74a-G.....>
 s s t k f a y v h s e y d k n c t r g f

AccIII
 781 aaatactatg aattgatgac atttggagaa atactggagg gtccggaaaa agaaccaga
 tttatgatac ttaactactg taaacctctt tatgacctcc caggcctttt tcttgggtct
 >.....GH-M74a-G.....>
 k y y e l m t f g e i l e g p e k e p r

841 atgttttcta ggtcatttta ttgcccaca aatgctgtga actatcattc ttgtacgccg
 tacaaaagat ccagtaaaat aagcgggtgt ttacgacact tgatagtaag aacatgcggc
 >.....GH-M74a-G.....>
 m f s r s f y s p t n a v n y h s c t p

BsiEI
PvuI
BsmI BseRI BsrGI
 901 atcgtgactg tcaatgaagg atattttctt tgccttgaat gcacctctc agatcccttg
 tagcactgac agttacttcc tataaaagaa acggaactta cgtggaggag tctagggaac
 >.....GH-M74a-G.....>
 i v t v n e g y f l c l e c t s s d p l

961 tacaaagcaa atctatctaa tagcacattc catttgggtga tactgaggca taacaaggat
 atgtttcgtt tagatagatt atcgtgtaag gtaaaccact atgactccgt attgttctta
 >.....GH-M74a-G.....>
 y k a n l s n s t f h l v i l r h n k d

1021 gagaaaatag tttcaatgcc tagctttaac ctttctactg atcaagagta tgttcagata
 ctcttttatc aaagttacgg atcgaaattg gaaagatgac tagttctcat acaagtctat
 >.....GH-M74a-G.....>
 e k i v s m p s f n l s t d q e y v q i

EcoNI
 1081 atccctgcag aaggtggcgg cacagcagag agtggcaatc tttacttccc ttgtattgga
 tagggacgtc ttccaccgcc gtgtcgtctc tcaccgttag aaatgaaggg aacataacct
 >.....GH-M74a-G.....>
 i p a e g g g t a e s g n l y f p c i g

TaqII NruI
 1141 aggctcttac acaaacgagt caccatcct ttatgcaaaa agtcaaattg ttgcggaact
 tccgagaatg tgtttgctca gtgggtagga aatacgtttt tcagttaaac aagcgcttga
 >.....GH-M74a-G.....>
 r l l h k r v t h p l c k k s n c s r t

BbvCI
Bpu10I

1201 gatgatgaat cttgcctgaa aagttattac aatcaagggt cgcctcagca ccaagtagtc
ctactactta gaacggactt ttcaataatg ttagttccca gcggagtcgt ggttcacag
>.....GH-M74a-G.....>
d d e s c l k s y y n q g s p q h q v v

HincII

1261 aactgtctga taaggatcag aaatgcacag agagataatc caacctggga tggtatcaca
ttgacagact attcctagtc ttacgtgtc tctctattag gttggaccct acaatagtgt
>.....GH-M74a-G.....>
n c l i r i r n a q r d n p t w d v i t

HindIII

1321 gttgatctga ctaatacata cccaggatca aggagcagga tctttggaag cttctccaaa
caactagact gattatgtat gggtcctagt tctctgctct agaaaccttc gaagaggttt
>.....GH-M74a-G.....>
v d l t n t y p g s r s r i f g s f s k

AclI

1381 ccgatgcttt atcaatcatc agtatcatgg catactcttc ttcaggtagc agagataaca
ggctacgaaa tagttagtag tcatagtacc gtatgagaag aagtccatcg tctctattgt
>.....GH-M74a-G.....>
p m l y q s s v s w h t l l q v a e i t

BclVI

1441 gacctagata agtatcaatt ggactggttg gataccacct atatctctcg tcttgaggga
ctggatctat tcatagttaa cctgaccaac ctatgtggga tatatagagc aggacctcct
>.....GH-M74a-G.....>
d l d k y q l d w l d t p y i s r p g g

GsaI
BseYI

XcmI

1501 tctgagtgcc ctttcggaaa ttattgtcca acggtatgct gggaaggagc atataatgat
agactcacgg gaaagccttt aataacaggt tgccatacga cccttcctcg tatattacta
>.....GH-M74a-G.....>
s e c p f g n y c p t v c w e g t y n d

1561 gtctatagct taactccaaa taacgatctt tttgtcactg tgtatttgaa gagtgaacaa
cagatatcga attgagggtt attgctagaa aaacagtgc acataaactt ctcacttggt
>.....GH-M74a-G.....>
v y s l t p n n d l f v t v y l k s e q

SmaI
XmaI

1621 gttgcagaga acccttattt cgcaatcttc tcccgggac aaatcttgaa agaattccct
caacgtctct tgggaataaa gcgttagaag agggccctag tttagaactt tcttaaggga
>.....GH-M74a-G.....>
v a e n p y f a i f s r d q i l k e f p

BsiHKA1
ApaLI

NsiI
BtsI

1681 cttgatgcat ggataagcag tgcacgaact acgacaatat cgtgcttcat gttcaacaat
gaactacgta cctattcgtc acgtgcttga tgctgttata gcacgaagta caagttgtta
>.....GH-M74a-G.....>
l d a w i s s a r t t t i s c f m f n n


```
1741 gaaatttgggt gtatagctgc attagagatc acaagattga atgatgacat cataagacca
ctttaaacca catatcgacg taatctctag tggtctaact tactactgta gtattctggt
>.....GH-M74a-G.....>
  e i w c i a a l e i t r l n d d i i r p

                                     AgeI
                                     BsrFI
1801 atttattact ctttctgggt gcctactgat tgccggacac catatcccca caccggtaag
taaataatga gaaagaccga cggatgacta acggcctgtg gtataggggt gtggccattc
>.....GH-M74a-G.....>
  i y y s f w l p t d c r t p y p h t g k

1861 atgaccaggg ttcccttgcg ctccacatat aactactaa
tactgggtccc aagggaacgc gaggtgtata ttgatgatt
>.....GH-M74a-G.....>>
  m t r v p l r s t y n y
```

Publikationsliste

Veröffentlichungen

Activation of the Nipah virus fusion protein in MDCK cells is mediated by cathepsin B within the endosome-recycling compartment.

Diederich S, Sauerhering L, **Weis M**, Altmeppen H, Schaschke N, Reinheckel T, Erbar S, Maisner A. J Virol. 2012 Apr;86(7):3736-45.

Surface glycoproteins of an African henipavirus induce syncytia formation in a cell line derived from an African fruit bat, *Hypsignathus monstrosus*.

Krüger N, Hoffmann M, **Weis M**, Drexler JF, Müller MA, Winter C, Corman VM, Gützkow T, Drosten C, Maisner A, Herrler G. J Virol. 2013 Dec;87(24):13889-91.

Characterization of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins.

Weis M, Behner L, Hoffmann M, Krüger N, Herrler G, Drosten C, Drexler JF, Dietzel E, Maisner A. J Gen Virol. 2014 Mar;95(Pt 3):539-48.

Fusion activity of African henipavirus F proteins with a naturally occurring start codon directly upstream of the signal peptide

Weis M, Behner L, Binger T, Drexler JF, Drosten C., Maisner A. Virus Research (submitted)

Poster:Functional characterization of newly identified African bat Henipavirus glycoproteins

Weis M, Erbar S, Drexler JF, Drosten C, Maisner A, EMBO Meeting 2012 Nizza, France

Endosomal Trafficking of the Nipah Virus Fusion Protein

Weis M, Sauerhering L, Diederich S, Maisner A, NSV 2013 Granada, Spain

Glycoproteins of a novel African bat henipavirus with limited biological activity

Weis M, Behner L, Drosten C, Drexler JF, Maisner A, ASV Meeting 2014, Fort Collins, USA

African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins have impaired fusogenic properties

Weis M, Behner L, Drosten C, Drexler JF, Maisner A, BatID Meeting 2014, Fort Collins, USA

The Nipah virus fusion protein is activated in early-recycling endosomal compartments

Weis M, Diederich S, Maisner A. Joint International Symposium on Mechanisms of cellular compartmentalization Collaborative Research Center SFB 593 and Graduate School GRK 1216, 2014, Marburg

Impaired biological activities of African bat henipavirus GH-M74a glycoproteins

Behner L, **Weis M**, Drosten C, Drexler JF, Maisner A. Joint International Symposium on Mechanisms of cellular compartmentalization Collaborative Research Center SFB 593 and Graduate School GRK 1216, 2014, Marburg

Vorträge:

Functional characterization of a newly identified African bat Henipavirus fusion protein.

Weis M, Behner L, Drosten C, Drexler JF, Maisner A. Klausurtagung des Sonderforschungsbereich 593 vom 06 – 10. 10. 2013 in Hirschegg, Kleinwalsertal

Bats as targets of virus research.

Weis M, Behner L, Maisner A. Graduate School 1216 „Intra- und interzellulärer Transport und Kommunikation“, Juli 2014, Marburg

Characterization of African bat henipavirus GH-M74a fusion protein.

Weis M, Behner L, Maisner A. Graduate School 1216 „Intra- und interzellulärer Transport und Kommunikation“, November 2014, Marburg

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die folgenden Damen und Herren:

Bauer, Bauer, Becker, Brehm, Bremmer, Burchert, Daut, Elsässer, Feuser, Garten, Grzeschik, Hassel, Huber, Jacob, Kaufmann, Kerwat, Lill, Lohöfer, Lohoff, Maisner, Moll, Mühlenhoff, Müller, Müller-Prüsselbach, Plant, Preißig-Müller, Raifer, Reiß, Schäfer, Schmidt, Suske, Visekruna, Weihe, Westermann, Wrocklage, Yu

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. A. Maisner für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die hervorragende und intensive wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. S. Becker danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Prof. Dr. C. Drosten danke ich für die Zurverfügungstellung der cDNA der GH-M74a-Glykoproteine sowie der Sequenz des weiteren F-Protein GH-p28.

Für die Finanzierung meiner Arbeit bedanke ich mich bei der Jürgen Manchot Stiftung.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Maisner möchte ich mich für das heitere und angenehme Klima im Labor und für die Unterstützung bei meiner Arbeit bedanken. Für AG-Seminare und GH-M74a- (Paper-) Diskussionen in „Überlänge“ möchte ich mit hiermit offiziell entschuldigen!

Ein besonderer Dank geht an Anja für unseren gemeinsamen Kampf gegen die schmutzige Seite. Laura und Lucie danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Erik danke ich für die Unterhaltungen in unserer Muttersprache Spanisch.

Joanna danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der QuikChange und die gute Laune im V-Markt.

Zusätzlich danke ich euch für die lustigen Kaffeepausen, Kinobesuche, Grillabende, Tagungen,.....

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, dass Sie mich während meines ganzen Studiums immer unterstützt haben. Ohne euch hätte ich das alles nicht geschafft!

VIELEN DANK!!